Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
Direktor: o. Professor Dr. Gunter Röhrborn
der Universität Düsseldorf

Spontane und induzierte Chromosomenaberrationen bei diabetischen und nichtdiabetischen Tieren der spezies cricetulus griseus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ute Rammelt
1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0132

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
Direktor: o. Professor Dr. Gunter Röhrborn
der Universität Düsseldorf

Spontane und induzierte Chromosomenaberrationen bei diabetischen und nichtdiabetischen Tieren der spezies cricetulus griseus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ute Rammelt
1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Manfred Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Gunter Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Friedrich Arnold Gries

Meinen Eltern

G L I E D E R U N G

Seite

I) Einleitung und Problemstellung 7

II) Konnatale Mißbildungen unter den Nachkommen diabetischer Mütter 9

III) Der Spontandiabetes des chinesischen Hamsters 14

IV) Die Wirkung alkylierender Agentien unter besonderer Berücksichtigung von Trenimon® 18

V) Eigene zytogenetische Untersuchungen an den Chromosomen der Knochenmarkszellen des chinesischen Hamsters 27

1) Material und Methode
   a) Behandlung 27
   b) Versuchsdaten 27
   c) Versuchsanordnung 28
   d) Chromosomenpräparation 29
   e) Kriterien der Auswertung 31

2) Versuchsergebnisse
   a) Befunde an unbehandelten diabetischen und nichtdiabetischen Tieren 33
   b) Versuch 1 : 0.062 mg/kg Trenimon 34
   c) Versuch 2 : 0.125 mg/kg Trenimon .....
   d) Tabellen 37
   e) Graphiken 40

VI) Diskussion 46

VII) Zusammenfassung 49

VIII) Bildanhang 50

IX) Literaturübersicht 53

I) Einleitung und Problemstellung

Es gilt heute als gesichert, daß Diabetikerinnen ein zwei- bis sechsfach erhöhtes Risiko tragen, Kinder mit angeborenen Mißbildungen zur Welt zu bringen, als stoffwechselge sunde Frauen (White, 1952; Herre und Horký, 1964; Pedersen et al., 1964; Kucera et al., 1965; Lenz und Kucera, 1967; Day und Insley, 1976; Chung und Myrianthopoulos , 1975; Goodman, 1976; Soler et al., 1976).

Über die Ursachen dieser Mehrbelastungen liegen bisher keine eindeutigen Forschungsergebnisse vor; meist werden jedoch die Stoffwechselinstabilität der diabetischen Schwangeren und die komplizierende Angiopathie zur Erklärung herangezogen. Über eine eventuelle genetische Prädisposition zu der höheren Fehlbildungsquote liegen Statistiken vor, die besagen, daß Nachkommen diabetischer Väter nicht häufiger von angeborenen Fehlbildungen betroffen sind als solche stoffwechselgesunder Eltern (Chung und Myrianthopoulos, 1975).

Die Suche nach der kausalen Genese der Mißbildungen erscheint umsomehr angezeigt, als der Diabetes mellitus sich in den vergangenen Jahren zu einer echten "Volkskrankheit" entwickelt hat. Darüberhinaus hat die Fertilität der Diabetikerinnen, die vor der Insulinaera nur etwa 5 % ausmachte, inzwischen fast normale Werte erreicht: 80 bis 90 % (von Oldershausen, 1977). Solche enormen Fortschritte konnten erzielt werden dank der heute üblichen engmaschigen metabolischen und gynäkologischen Überwachung der diabetischen Schwangeren und dank der modernen perinatalen Intensivmedizin.

Ausgehend von der Vorstellung, daß über Jahre bestehende pathologische Stoffwechselbedingungen wie Hyperglykämie und Ketoazidose das genetische Material der Soma- und der Keimzellen verändern könnten, ging ich in dieser Arbeit folgenden Fragen nach:

1. Zeigen diabetische Individuen eine größere Anzahl spontaner Chromosomenaberrationen als stoffwechselgesunde?

2. Reagieren diabetische Individuen sensibler auf ein bekanntes Mutagen als stoffwechselgesunde?

Zur Beantwortung der ersten Frage gelangt man gewiß auch durch Untersuchungen am Menschen, die aber erheblichen Aufwand verursachen würden. Den Menschen zu einem Forschungsobjekt der Art zu machen, wie es die zweite Fragestellung verlangt, verbietet sich aus ethischen Gründen. Daher wurden in beiden Fällen chinesische Hamster als Versuchstiere herangezogen, deren Diabetestyp dem Typ I des Menschen sehr ähnlich ist.

II) Konnatale Mißbildungen unter den Nachkommen diabetischer Mütter

In den letzten 30 Jahren ist die fetale und perinatale Mortalitätsrate der Kinder diabetischer Mütter dramatisch zurückgegangen. So berichtete Henley im Jahre 1947 über 40 %, Jervell et al. im Jahre 1979 über 4.3 % perinatale Sterblichkeit diabetischer Neugeborener. Diese positive Entwicklung ist zurückzuführen auf die Fortschritte der Perinatalmedizin, die intensive gynäkologische Überwachung, vor allem aber auf die heute üblichen engmaschigen Stoffwechselkontrollen der diabetischen Schwangeren, denn es gilt der Grundsatz, daß, je straffer die Einstellung des mütterlichen Diabetes gehandhabt wird, desto kleiner die Rate der fetalen und perinatalen Mortalität aufgrund von Fehlgeburten und aufgrund des Atemnotsyndroms beim Neugeborenen ist (Pedersen et al., 1974; Soler et al., 1976; Jervell et al., 1979).

Über 25 Jahre nahezu unbeeinflußt blieb jedoch die Inzidenz kongenitaler Mißbildungen unter den Nachkommen von Diabetikerinnen (Soler, 1976); in den letzten Jahren haben die angeborenen Mißbildungen das Atemnotsyndrom als Haupttodesursache überholt (Amendt, 1975; Soler, 1976; Gabbe et al., 1977; Gamsu, 1978).

Dieser Tatsache kommt umso mehr Bedeutung zu, als die diabetische Schwangerschaft weit eher mit dem Risiko eines mißgebildeten Kindes belastet zu sein scheint. Rubin und Murphy (1958) und Farquhar (1959), der in Edinburgh eine Serie von nur 100 Fällen untersuchte, konnten zwar unter den Kindern diabetischer Mütter keine erhöhte Frequenz angeborener Fehlbildungen feststellen. Dagegen stellt White's Veröffentlichung aus dem Jahre 1952, in der sie unter den Nachkommen von Diabetikerinnen 80 % mißgebildet fand, jedoch nur 1.8 % unter denen der Kontrollgruppe, sicherlich einen Extremwert dar, dessen Bedeutung ich nur schwer einzuschätzen vermag. Zahlreiche andere Autoren

beschrieben aber ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko (Pedersen et al., 1964; Herre und Horký, 1964; Kucera et al., 1965; Lenz und Kucera, 1976; Soler et al., 1976). Drei in den letzten Jahren veröffentlichte Statistiken weisen aus, daß Diabetikerinnen etwa doppelt so häufig mißgebildete Kinder zur Welt bringen wie stoffwechselgesunde Frauen: Bei Chung und Myrianthopoulos (1975) stehen 17.9 % schwer fehlgebildeten Neugeborenen diabetischer Mütter 8.3 % solchen nichtdiabetischer gegenüber; bei Day und Insley sind es 12 % resp. 6 % (1976); bei Goodman (1976) 1.76 % resp. 0.86 %. Die stark schwankenden Zahlenangaben lassen sich erklären durch unterschiedliche Untersuchungskollektive - besser und schlechter überwachte und behandelte diabetische Schwangere - und durch verschieden gewählte Definitionen des Begriffes Mißbildung.

Übereinstimmung herrscht darüber, daß mütterlicher Diabetes mellitus prinzipiell mit jeder Art von kindlicher Mißbildung vergesellschaftet sein kann, wobei sicherlich zu berücksichtigen ist, daß diese Fehlbildungen eher unter dem Gesichtspunkt der Phasenspezifität der Teratogenese denn als Folge einer spezifischen Noxe zu betrachten sind (Pache, 1977). Es sind unter anderem beschrieben: Anenzephalus, Mikrozephalus, Hydrozephalus, Spina bifida, Meningomyelozele, Hypoplastische Mandibula, Cheilognathopalatoschisis, Phokomelie, Hexadaktylie, Tibiaaplasie, Pes varus und valgus, Zwerchfell- und Inguinalhernien, Exomphalos, Hydrozele, Hypospadie etc.

Neben dieser Fülle ganz verschiedenartiger Fehlbildungen haben sich jedoch zwei "Syndrome" herauskristallisiert, die eine gewisse Spezifität zu besitzen scheinen: die angeborenen Herzfehler einschließlich der Mißbildungen der großen Gefäße (Pedersen, 1967; Rowland et al., 1975; Soler et al., 1976; Day und Insley, 1976; Malins, 1978) und das sogenannte "Kaudale Regressionssyndrom", das zuerst von Duhamel (1961) so bezeichnet wurde. Es handelt sich dabei um gelegentlich einzeln, meist aber multipel auftretende Fehlbildungen der unteren Körperhälfte: Flexion und Außenrotation der häufig

hypoplastischen unteren Extremitäten, Anomalien der Lendenwirbelsäule und des Kreuzbeins (bis hin zur völligen Agenesie), Analatresie, Nierenagenesie und Mißbildungen der Harnwege (häufig auch Zystennieren), Agenesie oder Mißbildungen der Geschlechtsorgane mit Ausnahme der Gonaden.

Einigen Arbeitsgruppen fiel die Häufung des Syndroms unter den Nachkommen diabetischer Frauen auf (Blumel et al., 1959; Pedersen et al., 1964; Lenz und Meier, 1964; Kucera et al., 1965; Rusnak et al., 1965; Lenz und Kucera, 1967). Sie stellten die Hypothese eines Kausalzusammenhangs zwischen der Krankheit der Mutter und dem Mißbildungssyndrom des Kindes auf. Wilson und Vallance-Owen (1966) gingen sogar soweit zu fordern, daß gesunde Mütter von Kindern mit Kaudaler Hypoplasie als essentielle Diabetiker zu betrachten seien. Sie fanden auch tatsächlich unter solchen Frauen gehäuft die für Diabetiker charakteristische Erhöhung des Insulinantagonisten "Synalbumin". Statistiken scheinen solche Ergebnisse zu bestätigen:
Angaben über die Häufigkeit des Syndroms schwanken zwischen 1 : 182 (Thalhammer et al., 1968) und 1 : 1000 (Pfeifer und Lenz, 1968) unter den Nachkommen von Diabetikerinnen, während es nach Thalhammer et al. in der Gesamtpopulation nur in einem von 125 000 Fällen auftritt!

Auf der Suche nach der Ursache der mißglückten Morphogenese lieferten Ergebnisse an Tierembryonen wertvolle Hinweise: Büchner (1955) erzielte nach experimentellem Sauerstoffmangel das sogenannte "rumplessness" (Schwanzlosigkeit) und mannigfaltige andere Fehlbildungen der unteren Körperhälfte beim sich entwickelnden Hühnchen; Rübsaamen (1971) fand bei gezieltem Sauerstoffentzug zu bestimmten Zeitpunkten der Embryogenese so spezifische Fehlbildungen wie Anchiepodie, Darmstenosen, Analatresie, Mikromelie und Vitien. Multiple Fehlbildungen entsprechend dem menschlichen Kaudalen Regressionssyndrom beschrieb auch Duraiswami (1950) am Hühnchenembryo nach durch Insulin ausgelöster Hypoglykämie; und Deuchar (1977) konnte zahlreiche Fälle von inkompletter sakraler Ossifikation unter den Foeten alloxan- und streptotozininduziert

diabetischer Ratten nachweisen.

Es liegen aber nach wie vor keine endgültigen Resultate zur Ätiologie des KRS vor. Manche Autoren folgten der Sauerstoffmangelhypothese und machten die diabetischen Gefäßkomplikationen für die Teratogenese verantwortlich (Pedersen et al., 1964; Kucera et al., 1965; Malins, 1978); andere hoben den Einfluß der Stoffwechselinstabilität hervor (Chung und Myrianthopoulos, 1975; Amendt et al., 1974; Amendt, 1975). Herre und Horky (1964) beobachteten eine signifikant erhöhte Mißbildungsrate nach hypoglykämischen Schocks in der Frühschwangerschaft; Wickes (1954) berichtete hingegen über acht Nachkommen von schizophrenen Schwangeren, die in den ersten Wochen nach der Konzeption mit Insulinschocktherapie behandelt worden waren: in keinem Fall traten typische Fehlbildungen auf. Auch Pedersen et al. (1964) fanden nach Hypoglykämien in der Frühschwangerschaft kein gehäuftes Auftreten mißgebildeter Kinder. Karlsson und Kjellmer (1972) meinten eine Abhängigkeit der Fehlbildungsfrequenz vom mittleren Glukosespiegel der Mutter während der Schwangerschaft zu erkennen: Lag er unter 100 mg%, traten in 3.8 % ihrer Fälle Mißbildungen auf, darüber in 16 %. - Die meisten Autoren sind sich in der Tendenz einig, daß der zunehmende Schweregrad des mütterlichen Diabetes der White-Klassen C, D und F die Entwicklung des Kindes in utero negativ beeinflußt (Koller, 1953; Amendt et al , 1974; Soler et al., 1976; Chung und Myrianthopoulos, 1978).

Die Möglichkeit, daß das Insulin selbst für die kongenitalen Mißbildungen verantwortlich sein könnte, ist wiederholt geprüft worden; allem Anschein nach ist der Embryo aber während der teratogenetisch kritischen ersten sieben Wochen (Mills et al., 1979) seiner Entwicklung weder mütterlichem noch eigenem Insulin ausgesetzt. Denn einerseits scheint Insulin die Plazentarschranke nicht zu passieren, wie radioimmunologische Untersuchungen von Adam et al. (1969) und Kalhan et al. (1975) erwiesen, und andererseits setzt die fetale Insulinproduktion frühestens in der achten Schwangerschaftswoche ein (Steinke und Driscoll, 1965).

Auch Therapieeinflüsse wurden diskutiert: Im Tierversuch an schwangeren Ratten erwies sich Carbutamid, ein orales Antidiabetikum der ersten Sulfonylharnstoffgeneration, in hohen Dosisbereichen als teratogen (DeMeyer und Isaac-Mathy, 1958). Watson et al. (1976) fanden einen mutagenen Effekt des gebräuchlichen Chlorpropamid auf menschliche Lymphozyten in vivo und postulierten aufgrund ihrer Ergebnisse eine gleichzeitige Schädigung der Gonaden mit Gefahr für nachfolgende Generationen. Bisher fehlt jedoch jeder sichere Anhalt für eine teratogene Aktivität der Sulfonylharnstoffe beim Menschen (Jackson, 1962 und 1968; Amendt et al., 1974; Soler et al., 1976).

III) Der Spontandiabetes des chinesischen Hamsters

Schon seit Beginn unseres Jahrhunderts erfreut sich der chinesische Hamster (Cricetulus griseus) größter Beliebtheit als kleines Versuchstier. Zunächst wurde er wegen seiner niedrigen Chromosomenzahl - 22 im diploiden Satz - und seiner kurzen Generationsfolge - Trächtigkeitsdauer 20.5 Tage - zu cytogenetischen Studien gehalten und gezüchtet. In der experimentellen Medizin fand er Verwendung wegen seiner Neigung zu Spontantumoren und wegen der Möglichkeit, seine Backentaschen zur Aufnahme von Gewebstransplantaten zu nutzen.

1959 bemerkten Meier und Yerganian in einer Kolonie chinesischer Hamster ein gehäuftes Auftreten von Polydipsie, Polyurie und plötzlichen Todesfällen. Blut- und Urinzuckerbestimmungen ergaben pathologische Werte, die um ein Vielfaches über der Norm lagen. Schmidt et al. (1970) schlüsselten über drei Jahre die Daten von fast 6000 Hamstern aufeinanderfolgender Generationen auf und fanden mit zunehmendem Grad der Inzucht eine Herabsetzung und verminderte Streuung des Manifestationsalters für die diabetische Stoffwechselstörung. Gerritsen et al. (1970) beobachteten eine Korrelation zwischen dem Schweregrad des elterlichen Diabetes mellitus und der Inzidenz der Anomalie unter den Nachkommen: Die Würfe ketotisch-diabetischer Elterntiere entwickelten zu 100 % einen Diabetes während der ersten acht Lebensmonate. Unter den Nachkommen weniger schwer erkrankter Eltern trat nur in bis zu 95 % eine Glukosurie auf, und dieser Prozentsatz schwankte noch dazu stark von Wurf zu Wurf der gleichen Eltern. Da außerdem auch Nachkommen stoffwechselgesunder Elternpaare einen Diabetes entwickelten, schlossen die Autoren, "daß die Heredität des diabetischen Syndroms des chinesischen Hamsters komplexer Natur ist und nicht aufgrund des Einflusses eines einzelnen rezessiven Gens erklärt werden kann."

Zur Genetik des Diabetes mellitus dieser Spezies existieren bisher zwei Theorien: Die erste stellte Yerganian 1964 auf. Er vermutete ein Zusammenwirken modifizierender Gene, die

aktivierend auf mutierte Genloci wirken. Mit zunehmender Homozygotie dieser Modifikatoren muß dann mit der Manifestation des Diabetes mellitus gerechnet werden. Butler (1967) sowie Butler und Gerritsen (1970) dagegen verwarfen die Hypothese vom "ruhenden diabetischen Gen" und schlugen stattdessen die Annahme eines polygenetischen Systems von mindestens vier Genen vor, von denen jeweils die Homozygotie von zweien einen Diabetes hervorruft. Zusätzliche Gene beeinflussen ihrer Meinung nach Dauer, Schwere und Regelmäßigkeit der manifesten Glukosurie; Homozygotie für drei Gene führt nach ihren Züchtungsergebnissen mit einer Penetranz von 50 % zur Ketoazidose.

Zu den charakteristischen Zügen des Diabetes beim chinesischen Hamster gehört vor allem das Fehlen einer vorausgehenden Periode der Hyperglykämie sowie das einer begleitenden Fettsucht, was die besondere Ähnlichkeit mit dem mageren iuvenilen Diabetestyp beim Menschen ausmacht. Hier wie da liegt der Erkrankung pathogenetisch eine rasch voranschreitende B-Zellinsuffizienz des Pankreas zugrunde. Carpenter et al. (1967) und Like et al. (1974) beobachteten bei erkrankten und stoffwechselgesunden Geschwistertieren eine Verminderung, Degranulierung und Vakatfettbildung an der Stelle untergegangener Inselzellen. Bedingt durch genetische Faktoren scheint die B-Zelle unfähig zu sein, eine adäquate Insulinproduktion und -sekretion aufrechterhalten zu können (Herberg, 1975).

Im Gefolge der Stoffwechselentgleisung treten beim chinesischen Hamster, ganz ähnlich wie beim Menschen, Begleiterkrankungen auf: Sirek et al. (1969) und Soret et al. (1973) und zahlreiche andere Arbeitsgruppen beobachteten mit zunehmender Verschlechterung der Stoffwechsellage Retinopathien aufgrund kapillärer und arteriolärer Aneurysmen und Nierenveränderungen im Sinne einer diabetischen Glomerulosklerose. McCombs et al. (1974) wiesen diskrete Gefäßwandveränderungen der Aorta diabetischer chinesischer Hamster nach, die sie als

den Beginn einer schweren Makroangiopathie ansahen. Schlaepfer et al. (1974) demonstrierten eine segmentale Demyelinisierung peripherer Nerven besonders an ketotisch-diabetischen Hamstern als pathologisch-anatomisches Substrat der diabetischen Polyneuropathie. Auch endokrine Veränderungen durch Degeneration von Leydigzellen und Keimepithel bei männlichen Tieren sind beschrieben (Federlin et al., 1970), ebenso wie die charakteristische Periodontitis(Cohen et al., 1961).

Neben diesen Parallelen zum menschlichen diabetischen Syndrom scheinen mir die Ergebnisse der Fütterungsexperimente, die die Arbeitsgruppe um Gerritsen zu Beginn der 70-er Jahre durchführte, von großer Bedeutung zu sein für die Beurteilung der Pathogenese des Diabetes mellitus. Gerritsen et al. (1974, 1976) stellten fest, daß praediabetische Hamster, die mit normalem Geburtsgewicht als Nachkommen ketonurischer Elterntiere geboren werden, von Geburt an hyperphagisch sind. Die erhöhte Nahrungsaufnahme, verbunden mit größerer Wachstumsrate und Gewichtszunahme, geht der Glukosurie voraus. Praediabetische Hamster, die ad libitum gefüttert wurden, starben frühzeitig, nachdem sie in den ersten Lebensmonaten Glukosurie und Ketonurie entwickelt hatten. Diätetische Limitierung während der Entwöhnungsphase der Jungtiere veränderte den Verlauf der Erkrankung nicht; restriktive Fütterung während der ersten 150 Lebenstage zögerte die Manifestation des Diabetes heraus und führte bei nachfolgender Fütterung ad libitum nur zu einer milden Glukosurie ohne Ketonurie der betroffenen Tiere. "Potentielle Diabetiker", die 30 Monate lang bei normaler, nicht hyperphagischer Nahrungsaufnahme gehalten wurden, blieben klinisch unauffällig!

Ergänzende Untersuchungen von Grodsky et al. (1974) mit fettreicher bzw. fettarmer Diät ergaben eine Abnahme der Glukosurie und ein Verschwinden der Ketonurie nach der Fütterung ketotisch-diabetischer Hamster mit der fettreduzierten Nahrung.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist kaum zu überschätzen, wenn man sich vor Augen führt, daß 80 % aller neuentdeckten menschlichen Diabetiker übergewichtig sind (von Oldershausen, 1977) und ein Drittel bis fast die Hälfte aller Diabetiker ausschließlich mit Diät behandelt werden könnte (Förster und Mehnert, 1976).

Im augenblicklichen Zustand der Unwissenheit über den tatsächlichen Vererbungsmodus der so heterogenen Stoffwechselanomalie Diabetes mellitus beim Menschen mag die Hypothese von der Kombination einer polygenetischen oder multifaktoriellen Vererbung mit einigen, bisher in ihrer Bedeutung schwer einzuordnenden Umwelteinflüssen, die gemeinsam zu einer Manifestation der Erkrankung führen sollen, noch am ehesten eine schlüssige Erklärung der vielfältigen Phänomene ermöglichen (Ganda und Soeldner, 1977). Unter diesem Vorbehalt stellt das diabetische Syndrom des chinesischen Hamsters, dessen multifaktorielle Vererbung als gesichert gelten kann, ein sehr wertvolles Tiermodell dar, das sowohl den Typ des menschlichen Alters als auch den des menschlichen juvenilen Diabetes repräsentiert (Gundersen et al., 1967; Dulin und Gerritsen, 1972), weil einerseits Zeitpunkt und Schwere der Manifestation der Erkrankung stark ernährungsabhängig zu sein scheinen, andererseits bei manifestem Diabetes mellitus ein echter Insulinmangel besteht.

IV) Die Wirkung alkylierender Agentien unter besonderer Berücksichtigung von Trenimon°

In dieser Arbeit diente Trenimon° (Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4) als Testsubstanz, um zu untersuchen, ob diabetische Hamster eine empfindlichere Reaktion auf Mutagene zeigen als stoffwechselgesunde. Das alkylierende Agens Trenimon° gilt - besonders seit den Veröffentlichungen von Röhrborn und Mitarbeitern (1965, 1969, 1971) - als bei allen Spezies sicher mutagen wirkende Substanz.

1) Allgemeine Mutationsmechanismen

Alkylierende Agentien sind chemische Verbindungen, die durch nukleophile Substitution Alkylreste an elektronenreiche Gruppen biologischen Materials binden. Solche nukleophilen Gruppen sind zum Beispiel neben den Carboxy-Sulfhydryl- und den terminalen Aminogruppen der Proteine die Phosphoryl- und die aromatischen Aminogruppen der Nukleinsäuren. Je nach der Zahl der reaktiven Alkylgruppen unterscheidet man mono- und polyfunktionelle alkylierende Agentien.

Nach Bautz und Freese (1960) reagieren die Alkylgruppen mit Guanin und Adenin an der N-7-Position und mit Adenin zusätzlich an den Positionen 1 und 3 (Abb. 1).

Brookes und Lawley isolierten 1961 nach DNA-Alkylierung in vitro ausschließlich N-7-Alkylguanin; 1963 fanden sie zusätzlich in 10 % der Alkylierungsreaktionen 3-Alkyladenin. Alkylierung von Guanin und Adenin in der DNA resultiert in beiden Fällen in einer langsamen Hydrolyse der alkylierten Basen vom Makromolekül. Diese Depurinisierung kann nun entweder durch Resynthetisierung der verlorengegangenen Base mit Hilfe ihres korrespondierenden Partners rückgängig gemacht werden, was sehr wahrscheinlich ist, solange die DNA in ihrer Doppelhelixform vorliegt; oder aber es könnte eine Punktmutation in Form einer Basenpaardeletion

eintreten (Brookes und Lawley, 1964). Es könnte aber auch, nachdem durch die Alkylierung in der N-7-Position des Guanins in N-1 ein quarternäres Stickstoffatom entstanden ist, zu einer Basenpaarung zwischen dem in dieser ionisierten Form vorliegenden Guanin und dem nun sterisch besser passenden Thymin kommen (Brookes und Lawley, 1961). Eine Transition hätte stattgefunden (Abb. 2).

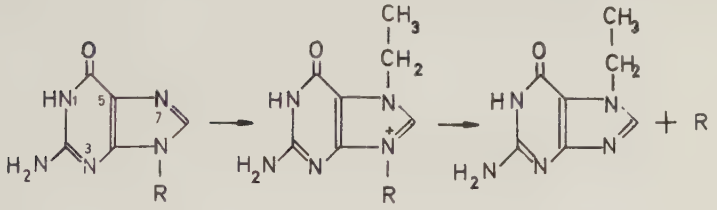


Abb. 1: Bildung von N-7-Alkylguanin (Bautz und Freese, 1960)

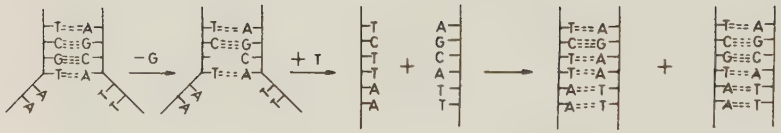


Abb. 2: Transition vom Guanin zum Thymin (Brookes und Lawley, 1961)

Weiterhin könnte man der Hypothese von Ross (1962) folgen: Nach primärer Alkylierung der Phosphoribosylgruppe der DNA soll eine Transalkylierung vom Phosphat zum N-7 des Guanins stattfinden (Abb. 3).

Wenn sich eine solche Transalkylierung jedoch nicht ereignete, könnte nach Röhrborn (1960, 1970) dennoch eine Mutation ausgelöst werden, indem nämlich die nach der Alkylierung instabilen Phosphattriester sich durch Abspaltung eines Substituenten zu stabilisieren suchten und es auf diese Weise zu Brüchen im Nukleotidstrang zwischen Desoxyribose und Phosphat käme. Dies könnte zu Nukleotidverlusten führen. Je nach der Lage der Brüche käme es zu Verlusten einzelner Nukleotide

oder ganzer Intercalarsegmente der DNA. Ereignete sich ein solcher Segmentverlust in nur einem Strang der Doppelhelix, könnte vom intakten Komplementärstrang ausgehend eine Resynthetisierung stattfinden. Lägen die DNA-Stränge jedoch im entspiralisierten Zustand der Replikationsphase vor, wäre eine Reparatur nicht mehr möglich - die Praemutation würde zur Mutation (Röhrborn, 1965 (Abb. 4).

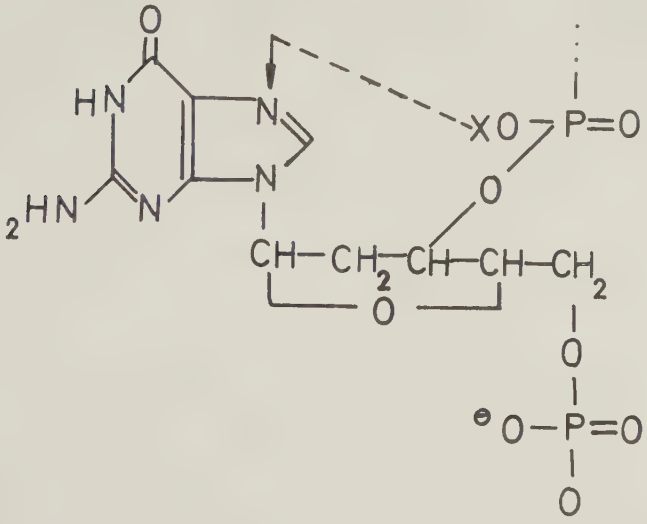


Abb. 3: Transalkylierung (Ross, 1962)

Als Erklärung für die "chromosomenbrechende Wirkung" der alkylierenden Substanzen führten Brookes und Lawley (1961) eine mögliche Alkylierung der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix an gegenüberliegenden Stellen an.

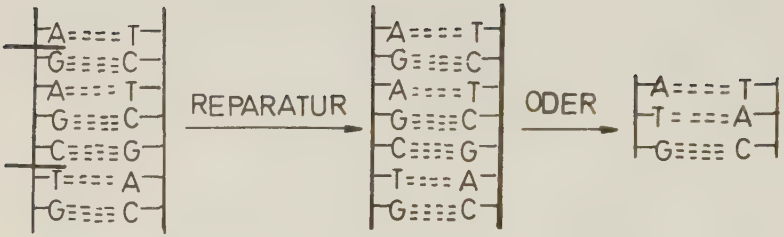


Abb. 4: Verlust eines Intercalarsegmentes der DNA (Röhrborn, 1965)

Zur besonderen Wirkungsweise der bifunktionellen Alkylantien beschrieben Brookes und Lawley (1961) neben dem Hauptalkylierungsprodukt 7-Alkylguanin zu einem geringen Teil Diguanin-Alkylprodukte, die durch Vernetzung (Cross-linking) zwischen den N-7-Atomen zweier Guaninbasen entstanden sein mußten. Solche Vernetzungen sind sowohl möglich zwischen den beiden Strängen der DNA (intrastrand crosslink) als auch zwischen zwei Helices (interstrand crosslink). Diese Fähigkeit zur Vernetzung verhindert die DNA-Replikation und könnte so zu inkompletter Verdopplung des genetischen Materials und damit zu großen Deletionen führen (Abb. 5).

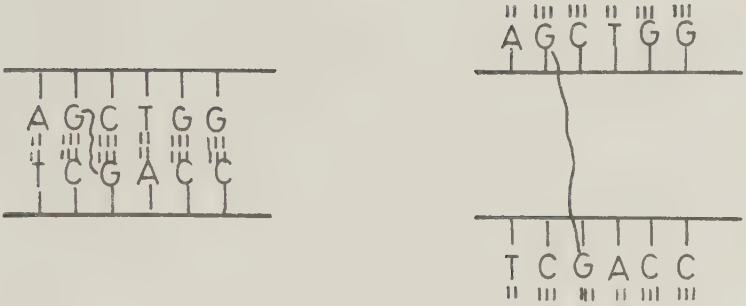


Abb. 5: Intrastrand und Interstrand Crosslink (Brookes und Lawley, 1961)

Lüers und Röhrborn (1965) berichteten von einem proportionalen Anstieg der Mutagenität alkylierender Agentien in Abhängigkeit von der Anzahl der reaktiven Gruppen, für den sie unter anderem den Mechanismus der Vernetzung verantwortlich machten. Obe (1968) testete drei chemisch verwandte Äthylenimine an menschlichen Leukozytenchromosomen. Dabei wählte er die molaren Konzentrationen der mono- (A 137), bi- (Chinon I) und trifunktionellen Substanz (Trenimon) jeweils so, daß die Zahl der reaktiven Gruppen in jeder Blutkultur gleich war. Die Frequenz der induzierten Chromosomenaberrationen lag bei A 137 am niedrigsten, bei Chinon I intermediär und am höchsten bei Trenimon. Er interpretierte diese Ergebnisse im Hinblick auf das Crosslinking. Lüers und Röhrborn sahen dagegen als Hauptursache

der größeren mutagenen Potenz der polyfunktionellen Verbindungen die mit steigender Anzahl reaktiver Gruppen zunehmende Affinität der alkylierenden Substanzen zu den nukleophilen Zentren in der DNA!

2) Das trifunktionelle Äthylenimin Trenimon° (Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4)

Die zu den alkylierenden Substanzen zählenden Äthylenimine gehören zu den stärksten chemischen Mutagenen (Lüers und Röhrborn), 1965). Ihre mutagene Potenz umfaßt alle untersuchten Objekte: höhere Pflanzen, Mikroorganismen, Drosophila, Säugetiere und Mensch (Röhrborn, 1965; Schleiermacher, 1966; Röhrborn und Vogel, 1969; Röhrborn und Hansmann, 1971; Röhrborn et al., 1971; Schmid et al., 1971; Hampel, 1968; Kaufmann et al., 1973; Basler et al., 1976).

Ihre biologische Wirksamkeit ist abhängig vom Vorhandensein bestimmter reaktiver Gruppen, die sehr wahrscheinlich nach den oben beschriebenen Mechanismen in den Zellzyklus eingreifen. Zahlreiche Angehörige dieser Gruppe zeichnen sich neben ihrer mutagenen Wirkung noch durch kanzerogene und ausgeprägte zytostatische Eigenschaften aus. Dabei sind mutagene und zytostatische Wirksamkeit weitgehend korreliert: Je mehr reaktive Gruppen ein Äthylenimin besitzt, um so größer ist seine zytostatische Wirkung, gilt auch in diesem Zusammenhang (Röhrborn, 1964).

Als Domagk, Petersen und Kraus (1954) mit dem 2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon-1,4 eine neue Gruppe Äthyleniminoverbindungen in die Therapie der malignen Tumoren einführten, wurden diese hochwirksamen Präparate zunächst sehr euphorisch begrüßt. Zwischen 1961 und 1965 gehörte Trenimon zu den meistverwandten Chemotherapeutika der malignen Erkrankungen (Vogel und Jäger, 1969). Vor allem Hämoblastosen und Retikulosen, aber auch solide Tumoren,

die rheumatoide Arthritis und andere Autoimmunerkrankungen wurden mit Trenimon behandelt (Linke, 1960; Tischendorf und Meyer-Hofmann, 1961; Chlud, 1974; Clark et al., 1974; Keitel et al., 1974; Kaether und Franz, 1975; Seidel et al., 1975; Wilde, 1975; Blau, 1976; Siering et al., 1976).

Trenimon ist das am stärksten wirksame Mutagen in der Gruppe der gebräuchlichen Äthylenimine (Lüers und Röhrborn, 1965).

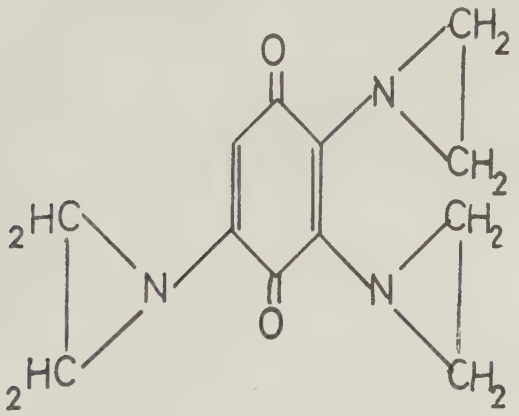


Abb. 6: Trenimon^{o} (Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4)

Diese Tatsache läßt sich wohl am ehesten mit der Anwesenheit dreier hochreaktiver Gruppen erklären, darüberhinaus aber sicher auch mit dem modifizierenden Einfluß des Restkörpers. So zeigten Lüers und Röhrborn, daß Trenimon nach Verfütterung an Männchen der Spezies Drosophila melanogaster stärker mutagen wirkte als das ebenfalls trifunktionelle Thio-Tepa. Kaufmann et al. (1973) bestimmten den Schwellenwert der mutagenen Aktivität auf menschliche Lymphozyten in vitro für Trenimon bei 2 mal 10^{-10} mol/l, einem Wert, der deutlich unter den Blutkonzentrationen in

therapeutischer Dosierung liegt.

Trenimon reagiert mit Nukleoprotein, indem eine Öffnung des gespannten Äthyleniminringes erfolgt und außerdem eine Aktivierung von Ribonukleasen eintritt (Siering und Abendroth, 1974). Trenimon wirkt hochdosiert in der S-Phase des Zellzyklus - wie oben beschrieben - niedrig dosiert in der G2-Phase. Letztere Wirkung erklärte die Arbeitsgruppe um Grunicke und Wolf (1973, 1975, 1977) mit einer Entkopplung der Histonsynthese von der vorausgegangenen DNA-Synthese: Trenimon in niedriger Dosierung bewirkte eine schnelle Abnahme der Inkorporation markierter DNA in Yoshida- oder Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. Grunicke et al. führten das auf eine Abnahme des Nukleosidtransportes in den Zellkern zurück, an dem membranständige SH-Gruppen beteiligt seien.

Das hochwirksame Zytostatikum Trenimon wurde in letzter Zeit klinisch fast nur noch intrakavitär in der Therapie der Pleura- und Peritonealkarzinosen eingesetzt, da es - im Gegensatz zum Beispiel zum Endoxan® (Cyclophosphamid), das erst in der Leber metabolisiert werden muß - in seiner Wirkform vorliegt (Kredel und Tittor, 1975; Schneider, 1978, persönliche Mitteilung). Dieser stark eingeschränkte Verwendungsbereich war sowohl Folge der hohen mutagenen Aktivität als auch der schwerwiegenden toxischen Nebenwirkungen des Präparates (Keitel et al., 1974): extreme Knochenmarksdepression, Magen-Darm-Unverträglichkeiten, nicht mehr beherrschbare bakterielle und virale Infektionen und sehr unangenehme Lokalreaktionen in Form von Thrombophlebitiden und lokalen Nekrosen bei intravenöser Anwendung (Berndt und Rieche, 1974; Chlud, 1974; Seidel et al., 1975; Wilde, 1975; Blau, 1976). Wenn auch Tumorpatienten in der Regel eine Neokanzerogenese nicht mehr erleben, so ist doch in Einzelfällen die Onkogenese als Spätwirkung des Trenimons diskutiert worden (Hunstein und Rohn, 1975).

In der BRD wird Trenimon heute weder hergestellt noch verwendet.

V) Eigene zytogenetische Untersuchungen an den Chromosomen der Knochenmarkszellen des chinesischen Hamsters

1) Material und Methode

Für meine Untersuchungen standen mir stoffwechselgesunde chinesische Hamster (Cricetulus griseus) aus der Zucht des Labors des Institutes für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf zur Verfügung. Die diabetischen Tiere entstammten der Zucht der Firma Thomae in Biberach an der Riss.

Behandlung

Als Testsubstanz diente das alkylierende Agens Trenimon (2, 3, 5-Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4) der Firma Bayer, das in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde. Pro Tier wurden 0.5 ml dieser Lösung intraperitoneal zweimal im Abstand von 24 Stunden injiziert. Zwölf Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere in Äther getötet und aufgearbeitet. Zwei Stunden vor der Aufarbeitung hatten die Tiere jeweils eine intraperitoneale Injektion von 8 mg/kg Colcemid erhalten.

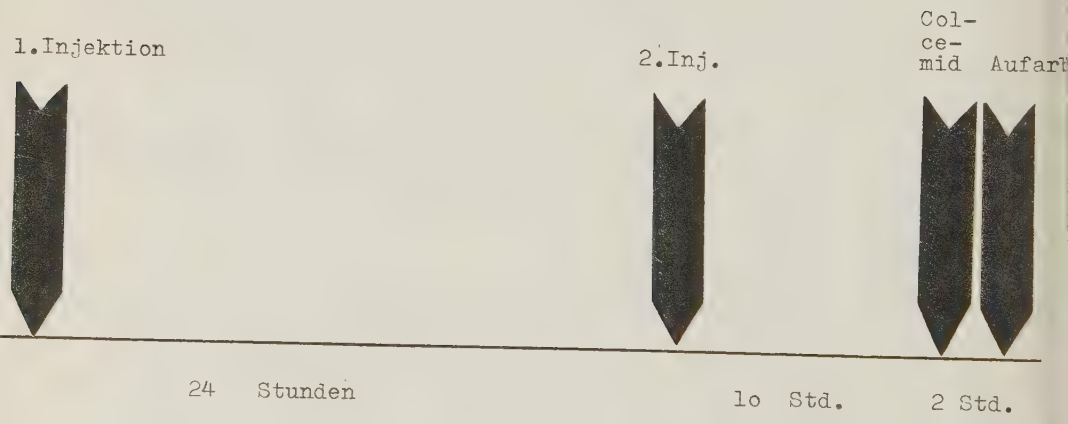
Die Kontrolltiere zur Feststellung der Spontanmutationsrate bei diabetischen und nichtdiabetischen Hamstern wurden nur mit Colcemid behandelt.

Versuchsdaten

Substanz	Trenimon (2, 3, 5-Tris-äthylen-iminobenzochinon-1,4)
Lösungsmittel	0.9 %-ige NaCl-Lösung
Applikationsart	intraperitoneal
Applikationsmenge	2 mal 0.5 ml
Applikationsintervall	24 Stunden
Dosis / Versuch 1	0.062 mg/kg Körpergewicht
Versuch 2	0.125 mg/kg Körpergewicht
Aufarbeitungsintervall	12 Stunden

Alter der Tiere	7 bis 15 Wochen
Versuchsgröße	3 diabetische und 3 stoffwechselgesunde Männchen sowie 3 diabetische und 3 stoffwechselgesunde Weibchen pro Dosis
Kontrollgruppe	3 diabetische und 3 stoffwechselgesunde Männchen sowie 3 diabetische und 3 stoffwechselgesunde Weibchen
Colcemiddauer	2 Stunden
Colcemidmenge	8 mg/kg Körpergewicht

Versuchsanordnung



Die zweimalige Applikation der mutagenen Substanz Trenimon erscheint angezeigt nach Ergebnissen von Schmid et al. (1971): Sie beobachteten einen sehr viel größeren mutagenen Effekt, wenn das Agens über zwei oder mehrere Zellzyklen einwirken konnte. Nach einmaliger Applikation selbst sehr hoher Einzeldosen lag die Rate geschädigter Chromosomen relativ niedrig, wofür die Autoren eine schnelle Metabolisierung und Ausscheidung des Mutagens verantwortlich machten.

Chromosomenpräparation

Das Knochenmark wurde nach der Methode von Miltenburger aufgearbeitet, einer modifizierten Methode nach Schmid et al. (1971) (Basler, persönliche Mitteilung):

1) Zwei Stunden vor der Aufarbeitung des Knochenmarks Tiere mit Colcemid (0.08 mg/10 g Körpergewicht) behandeln.

2) Den in Äther getöteten Tieren beide Femura herauspräparieren und von allen Weichteilen befreien.

3) Beide Epiphysen abschneiden, um einen Zugang zum Knochenmark zu schaffen.

4) Das Knochenmark mit zimmerwarmer Hank's Lösung mit einer Kanüle in ein Zentrifugenröhrchen herausspülen (1 ml pro Femur; 2-ml-Spritze; 12-er-Nadel). Die Röhrchen bei 30 °C im Wasserbad aufbewahren bis das Knochenmark aller Tiere herausgespült ist.

5) Gut suspendieren; 7 Minuten bei 1500 rpm zentrifugieren.

6) Hypotone Behandlung: mit ca. 2 ml 1 %-iger Natriumcitratlösung gut suspendieren und für 20 bis 25 Minuten bei 30 °C c inkubieren.

7) 7 Minuten bei 1200 rpm zentrifugieren.

8) Überstand besonders sorgfältig abgießen. Mit 2.5 ml Fixativ (Eisessig : Methanol / 1 : 2.5) Sediment aufpipettieren und 30 Minuten im Kühlschrank stehen lassen.

9) 7 Minuten bei 1500 rpm zentrifugieren.

10) Noch einmal fixieren. Eine Stunde bis über Nacht im Kühlschrank stehen lassen.

11) 7 Minuten bei 1500 rpm zentrifugieren.

12) Neu fixieren mit nur ca. 0.5 ml.

13) Ca. 8 Tropfen dieser Suspension mit einer Pasteurpipette auf Objektträger auftropfen, die zuvor in einem Äther-Äthanolgemisch gereinigt und in aqua dest. bei + 4 °C aufbewahrt wurden, dann verblasen, über dem Bunsenbrenner abflammen und 4 Sec. abbrennen lassen.

14) Präparate an der Luft trocknen lassen.

15) Am nächsten Tag in einer Giemsa/Titrisollösung (10 ml Giemsa + 190 ml gepuffertes aqua dest. pH 7.0) 10 Minuten färben. Anschließend in aqua dest. 2 mal 5 Minuten abspülen und abermals an der Luft trocknen lassen.

16) Mit Eukitt eindecken.

Die Chromosomenpräparation ist vor allem durch zwei Faktoren gefährdet: die Verklumpung der Knochenmarkszellen und die ungenügende Ausbreitung der Metaphaseplatte. Nach der hypotonen Behandlung sind die Zellen in einem besonders irritablen Zustand. Sie verklumpen, wenn man sie zu schnell zentrifugiert oder wenn man das Material vor Zusatz des Fixativs nicht sauber suspendiert. Eine saubere Streuung der Chromosomen wird erleichtert durch schnelles Trocknen der Objektträger über der heißen Flamme (Schmid et al., 1971).

Kriterien der Auswertung

Beim chinesischen Hamster sind zwei morphologische Besonderheiten zu beachten (Schmid et al., 1971): Die Sekundärkonstruktionen der langen Arme der X-Chromosomen dürfen nicht als Chromatidengaps angesehen werden. Ein oder mehrere der kleinen metazentrischen Chromosomen sehen gelegentlich wie azentrische Fragmente aus, was aber durch Nachzählen leicht zu klären ist.

Eine Unterscheidung zwischen Chromatidentyp- und Chromosomentypaberrationen erübrigt sich bei der Auswertung von Knochenmarksmetaphasen, weil sich die Zellen bei der Einwirkung des Mutagens nicht nur in der G 1-Phase sondern auch in der S- und der G 2-Phase befinden können und somit alle Aberrationstypen zu erwarten sind.

I) Numerische Aberrationen

1) Hyperploide Metaphasen

2) Hypoploide Metaphasen

Da bei der Methode der Chromosomenpräparation Verluste oder Zugewinne an Chromosomen einzelner Metaphasen durch zu weite Streuung nicht vermieden werden können und von daher nicht unbedingt einem mutagenen Effekt zugeordnet werden dürfen, werden in aller Regel nur Metaphasen mit einem vollständigen Chromosomensatz von 22 analysiert.

II) Strukturelle Aberrationen

1) Chromatidengap G`
Isochromatidengap G``
(Def.: färberische Lücke in einer bzw. beiden Chromatiden, die optisch zu einem Substanzverlust ohne Verlust der Kontinuität der Chromatidstruktur führt)

2) Chromatidenbruch B`
Chromosomenbruch B"
(Def.: sichtbare Unterbrechung der Chromatiden bzw. der Chromosomenstruktur mit seitlicher Dislokation des Fragmentes oder Verschiebung des Bruchstückes in der Längsachse)

3) Chromatidenfragment F`
Chromosomenfragment F"
(Def.: azentrische Chromatiden bzw. Chromosomenbruchstücke Zentrische Fragmente sind i.a. nicht von Deletionen zu unterscheiden und werden in der Regel diesen zugeordnet).

4) Interchange I`und I"
(Def.: Veränderung innerhalb zweier oder mehrerer Chromatiden).

5) Intrachange
(Def.: Veränderungen innerhalb eines Chromosoms. Hierzu sind auch die Deletionen D`und D" zu zählen, bei denen es sich um einen Segmentverlust auf Chromatiden- oder Chromosomenebene handelt). Interchange und Intrachange werden häufig als Exchange zusammengefaßt.

6) Multiple Aberrationen
(Def.: mehr als 5 Aberrationen pro Metaphase)

7) Pulverisation
(Def.: Das Chromatin ist in Form von Bruchstücken und punktförmigen Fragmenten vorhanden, vollstämdige Chromosomen sind nicht mehr zu erkennen).

Die statistische Sicherung der Ergebnisse erfolgte mit dem χ^2-Test. P-Werte unter 0.01 wurden als signifikant angesehen.

2) Versuchsergebnisse

Das Knochenmark der unbehandelten bzw. mit verschiedenen Dosen Trenimon vorbehandelten Tiere wurde - wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben - auf Objektträger verbracht.

Ausgewertet wurden jeweils 200 Metaphasen pro Tier bei einer Vergrößerung von 10 x 100 unter Ölimmersion. Die Objektträger waren codiert.

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die detaillierten Werte der Kontrollen sowie der trenimoninduzierten Aberrationsraten und -typen einschließlich der Befunde in den Einzeltieren für diabetische und nichtdiabetische Hamster getrennt. In Tabelle 3 findet sich ein direkter zusammenfassender Vergleich der Befunde in diabetischen und nichtdiabetischen Tieren.

Die Graphiken 1 bis 6 sollen die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Befunde unter verschiedenen Gesichtspunkten veranschaulichen.

a) Befunde an unbehandelten diabetischen und nichtdiabetischen Tieren

Als Kontrollgruppe dienten 6 diabetische und 6 nichtdiabetische Tiere, jeweils 3 Männchen und 3 Weibchen, die mit Ausnahme der Colcemid-Injektion 2 Stunden vor der Aufarbeitung keinerlei Behandlung erhielten.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die spontane Aberrationsrate in den Knochenmarkszellen sehr niedrig war:
Unter 2400 ausgewerteten Metaphasen fanden sich nur 9, die strukturelle Aberrationen aufwiesen. Dabei handelte es sich in 8 Fällen um Gaps, und in nur einer Knochenmarkszelle eines diabetischen Männchens fand sich ein Chromatidenbruch (s. Tab. 1). Das entspricht einer Gesamtaberrationsrate von 0.38 % einschließlich Gaps für alle unbehandelten Tiere. Dabei wiesen die diabetischen Tiere in 0.42 % spontan aberrante Zellen auf, die nichtdiabetischen in 0.33 %. Beim Einzeltier schwankte der Prozentsatz aberranter Metaphasen in der diabetischen Kontrollgruppe zwischen 0 und 1.5 %, in der nichtdiabetischen Kontrollgruppe

zwischen 0 und 1 %. Der minimale Unterschied zwischen den Aberrationsraten der beiden Kontrollgruppen stellte sich als statistisch nicht signifikant heraus.

Versuch 1 - 2 X 0.062 mg/kg Trenimon

Eine zweimalige Trenimonapplikation dieser Größenordnung induzierte in allen Fällen eine signifikante Zunahme der Anzahl aberranter Metaphasen.

Bei den 6 diabetischen Versuchstieren ergab sich eine Aberrationsrate von 5.0 % inclusive bzw. 2.8 % exclusive Gaps. Für das einzelne Tier rangierte der Prozentsatz aberranter Zellen zwischen 3.5 % und 6.0 % einschließlich Gaps, zwischen 2.0 % und 3.5 % ausschließlich derselben. Das Spektrum der strukturellen Aberrationen reichte von der Hauptgruppe der Gaps über Brüche, Fragmente, Deletionen und Exchangefiguren bis zu multiplen Aberrationen in zwei Fällen.

Bei den 6 nichtdiabetischen Versuchstieren fand sich inclusive Gaps eine Aberrationsrate von 6.1 %, exclusive Gaps eine von 3.6 %. Dabei schwankten die Einzelergebnisse zwischen 3.5 % und 9.5 % resp. 1.5 % und 7.0 %. Das Spektrum der strukturellen Aberrationen entsprach dem der diabetischen Tiere, wobei die geringfügig höhere Aberrationsrate der nichtdiabetischen Tiere vor allem in der Gruppe der Exchanges zu Buche schlug.

Die geringfügig höhere Aberrationsrate der nichtdiabetischen Tiere erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p > 0.2$).

Versuch 2 - 2 X 0.125 mg/kg Trenimon

In der Gruppe der diabetischen Tiere induzierte die verdoppelte Trenimonmenge eine Zunahme aberranter Metaphasen auf 16.1 % einschließlich Gaps, 12.5 % ausschließlich Gaps. Die individuelle Schwankungsbreite lag zwischen 7.5 % und 28.5 % resp. 3.5 % und 23.5 %. Die strukturellen Aberrationen waren schwerwiegender als nach der niedrigeren Dosis: Die Gaps bildeten nur noch die drittstärkste Gruppe nach Brüchen/Fragmenten und Exchangefiguren. Unter den 1200 ausgewerteten Metaphasen fanden sich 31, deren Chromosomenmaterial multipel aberrant bis zur Pulverisation verändert war.

In der Gruppe der nichtdiabetischen Tiere lag die Rate aberranter Zellen signifikant über der der diabetischen Tiere ($p<0.01$): 21.5 % einschließlich Gaps, 19 % ohne Berücksichtigung der Gaps, bei einer individuellen Schwankungsbreite zwischen 9.5 % und 31.0 % resp. 6.0 % und 29.5 %. Auffällig ist, daß diese höhere Aberrationsrate allein zu Lasten der multiplen Aberrationen geht, die viermal so zahlreich waren wie in der diabetischen Gruppe: 139 zu 31. Dabei schlagen sicherlich die 42 multipel aberranten Zellen unter den 200 ausgewerteten eines stoffwechselgesunden Weibchens als statistischer Ausreißer stark zu Buche, und es stellt sich die Frage nach der Herstellbarkeit wirklich standardisierter Versuchsbedingungen. Da die beiden Tiergruppen - diabetische und nichtdiabetische - aus der Zucht verschiedener Institute stammen, könnte der eine Tierstamm von

einer Virusinfektion befallen gewesen sein, die zu einer vorübergehenden Zunahme aberranter Zellen bei den betroffenen Tieren geführt haben könnte.

Tabelle 1

Diabetische Tiere

Dosis (mg/kg)	Tiere (n)	Metaphasen (n)	Zellen mit strukturellen Aberrationen				Zellen mit (n)				
			mit Gaps		ohne Gaps		G	B+F	D	I	m.A.
			n	%	n	%					
Kontrolle	6	1200	5	0.42	1	0.08	4	1	-	-	-
	M 1	200	3	1.5	1	0.5	2	1	-	-	-
	M 2	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M 3	200	2	1.0	-	-	2	1	-	-	-
	W 1	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W 2	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W 3	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mal 0.062	6	1200	60	5.0	33	2.8	27	18	6	7	2
	M 1	200	12	6.0	7	3.5	5	6	-	1	-
	M 2	200	9	4.5	6	3.0	3	3	-	2	-
	M 3	200	11	5.5	6	3.0	5	3	-	2	1
	W 1	200	10	5.0	4	2.0	6	2	2	-	1
	W 2	200	7	3.5	5	2.5	2	1	3	1	-
	W 3	200	11	5.5	5	2.5	6	3	1	1	-
2 mal 0.125	6	1200	193	16.1	150	12.5	43	64	8	47	31
	M 1	200	15	7.5	7	3.5	8	5	-	2	-
	M 2	200	21	10.5	18	9.0	3	6	2	5	5
	M 3	200	31	15.5	21	10.5	10	11	-	10	-
	W 1	200	32	16.0	27	13.5	5	12	6	9	6
	W 2	200	37	18.5	30	15.5	7	15	-	7	2
	W 3	200	57	28.5	47	23.5	10	15	-	14	18

Tabelle 2

Nichtdiabetische Tiere

Dosis (mg/kg)	Tiere (n)	Metaphasen (n)	Zellen mit strukturellen Aberrationen				Zellen mit (n)				
			mit Gaps		ohne Gaps		G	B+F	D	I	m.A.
			n	%	n	%					
Kontrolle	6	1200	4	0.33	-	-	4	-	-	-	-
	M 1	200	2	1.00	-	-	2	-	-	-	-
	M 2	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M 3	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W 1	200	2	1.00	-	-	2	-	-	-	-
	W 2	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W 3	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mal 0.062	6	1200	73	6.1	43	3.6	30	18	3	20	2
	M 1	200	15	7.5	8	4.0	7	4	-	4	-
	M 2	200	11	5.5	6	3.0	5	2	-	3	1
	M 3	200	11	5.5	7	3.5	4	3	1	3	-
	W 1	200	10	5.0	5	2.5	5	4	1	-	-
	W 2	200	7	3.5	3	1.5	4	-	-	3	-
	W 3	200	19	9.5	14	7.0	5	5	1	7	1
2 mal 0.125	6	1200	258	21.5	228	19.0	30	30	5	54	139
	M 1	200	44	22.5	41	20.5	3	7	-	13	21
	M 2	200	19	9.5	12	6.0	7	3	2	4	3
	M 3	200	42	21.0	35	17.5	7	7	1	5	22
	W 1	200	62	31.0	59	29.5	3	5	1	11	42
	W 2	200	44	22.0	42	21.0	2	5	-	11	26
	W 3	200	47	23.5	39	19.5	8	3	1	10	25

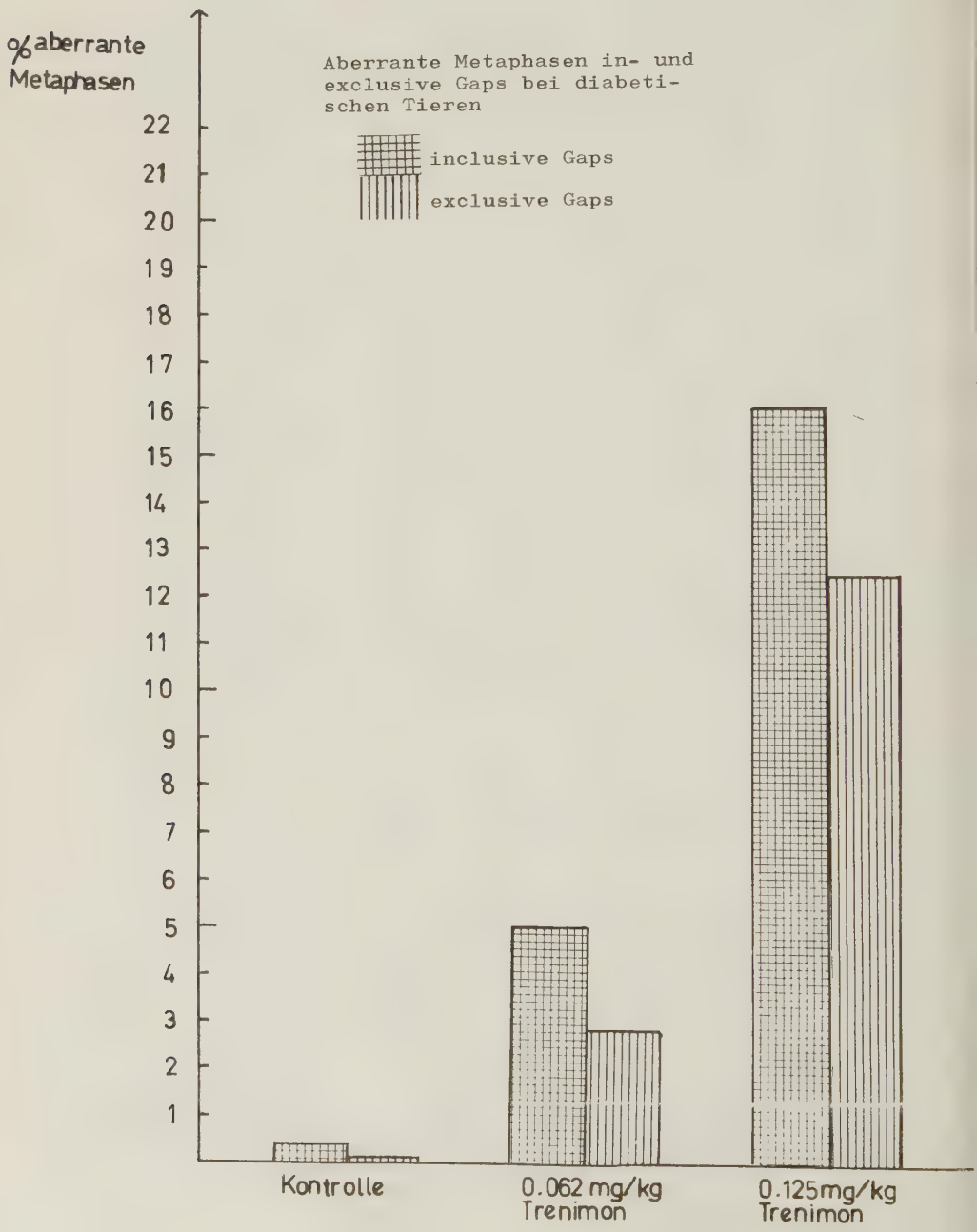
Tabelle 3

Diabetische Tiere - Nichtdiabetische Tiere im direkten Vergleich

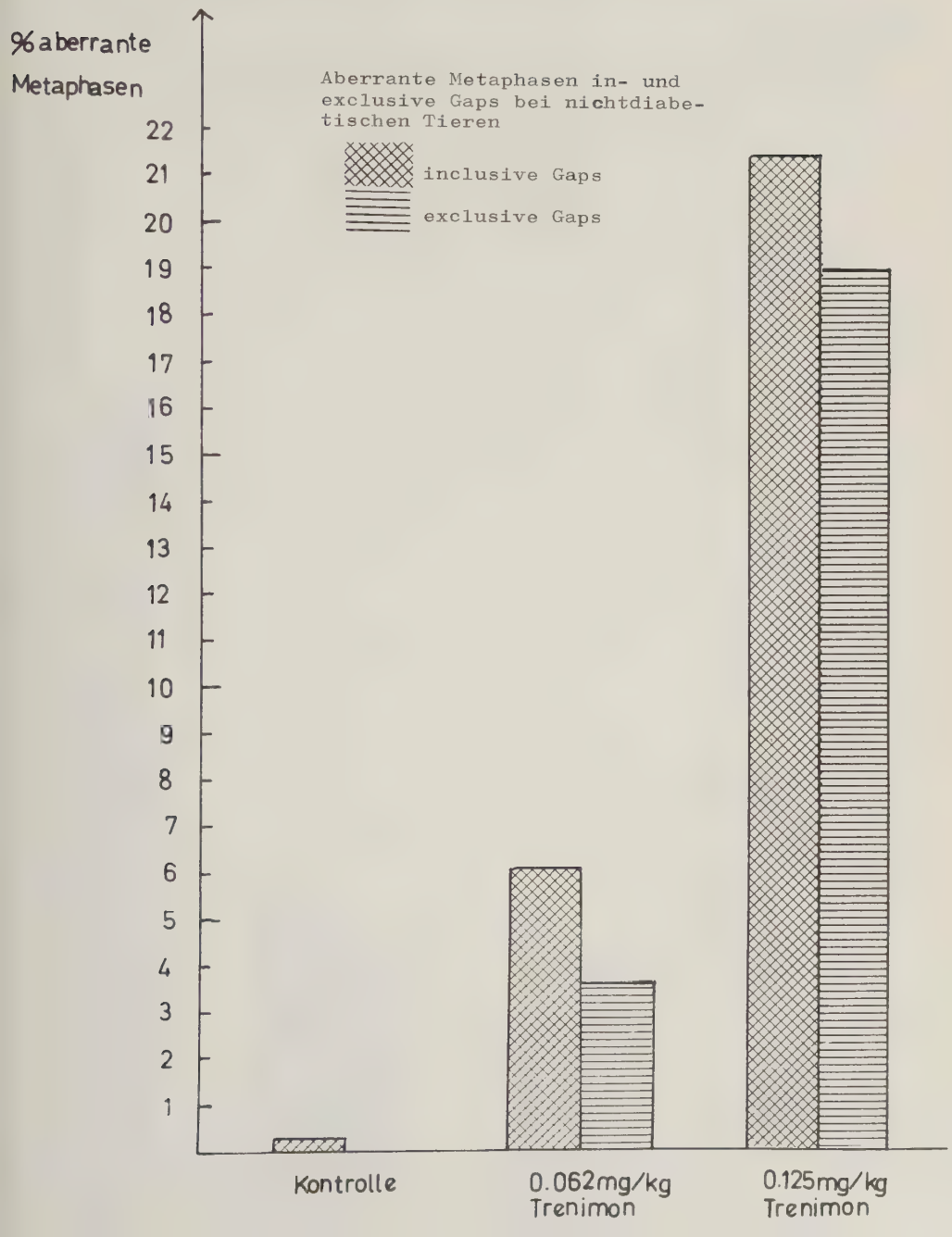
Dosis (mg/kg)	Tiere (n)	Metaphasen (n)	Diabetische Tiere Aberrante Metaphasen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	Nichtdiabetische Tiere Aberrante Metaphasen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%
Kontrolle	6	1200	5	0.42	1	0.08	4	0.33	-	-
2 mal 0.062	6	1200	60	5.0	33	2.8	73	6.1	43	3.6
2 mal 0 125	6	1200	193	16.1	150	12.5	258	21.5	228	19.0

Die statistische Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des χ^2-Testes ergab innerhalb der einzelnen Tiergruppen eine Signifikanz der ermittelten Dosis-Effekt-Beziehung ($p < 0.01$). Für die kleinere Trenimondosis fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Tieren ($p > 0.02$). Der statistisch signifikant größere Effekt der hohen Dosis auf die nichtdiabetischen Hamster ($p < 0.01$) ist nur von sehr beschränkter Aussagekraft (s. unter 2c).

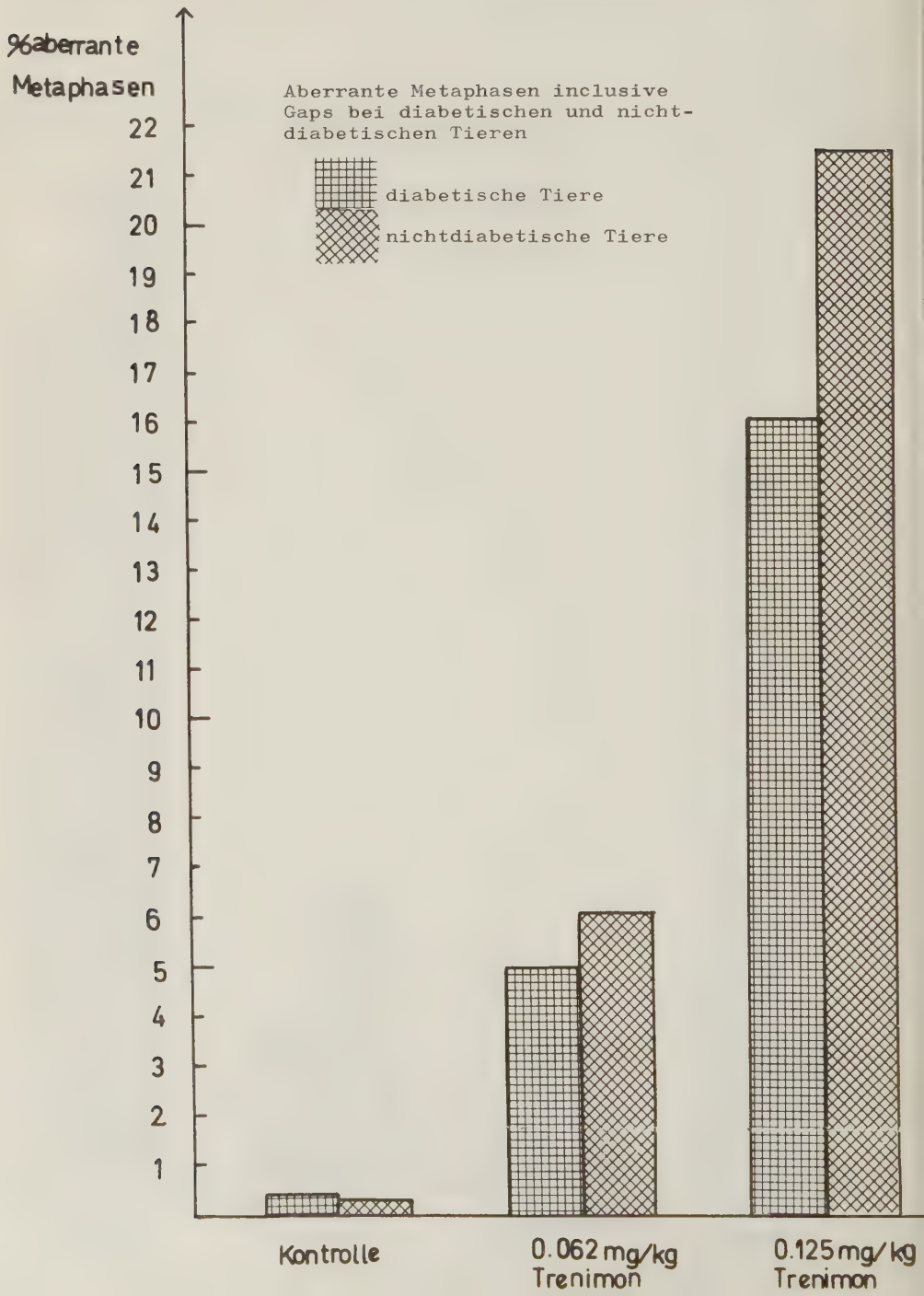
Graphik 1


% aberrante Metaphasen
Aberrante Metaphasen in- und exclusive Gaps bei diabetischen Tieren
inclusive Gaps
exclusive Gaps
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Kontrolle
0.062 mg/kg Trenimon
0.125mg/kg Trenimon

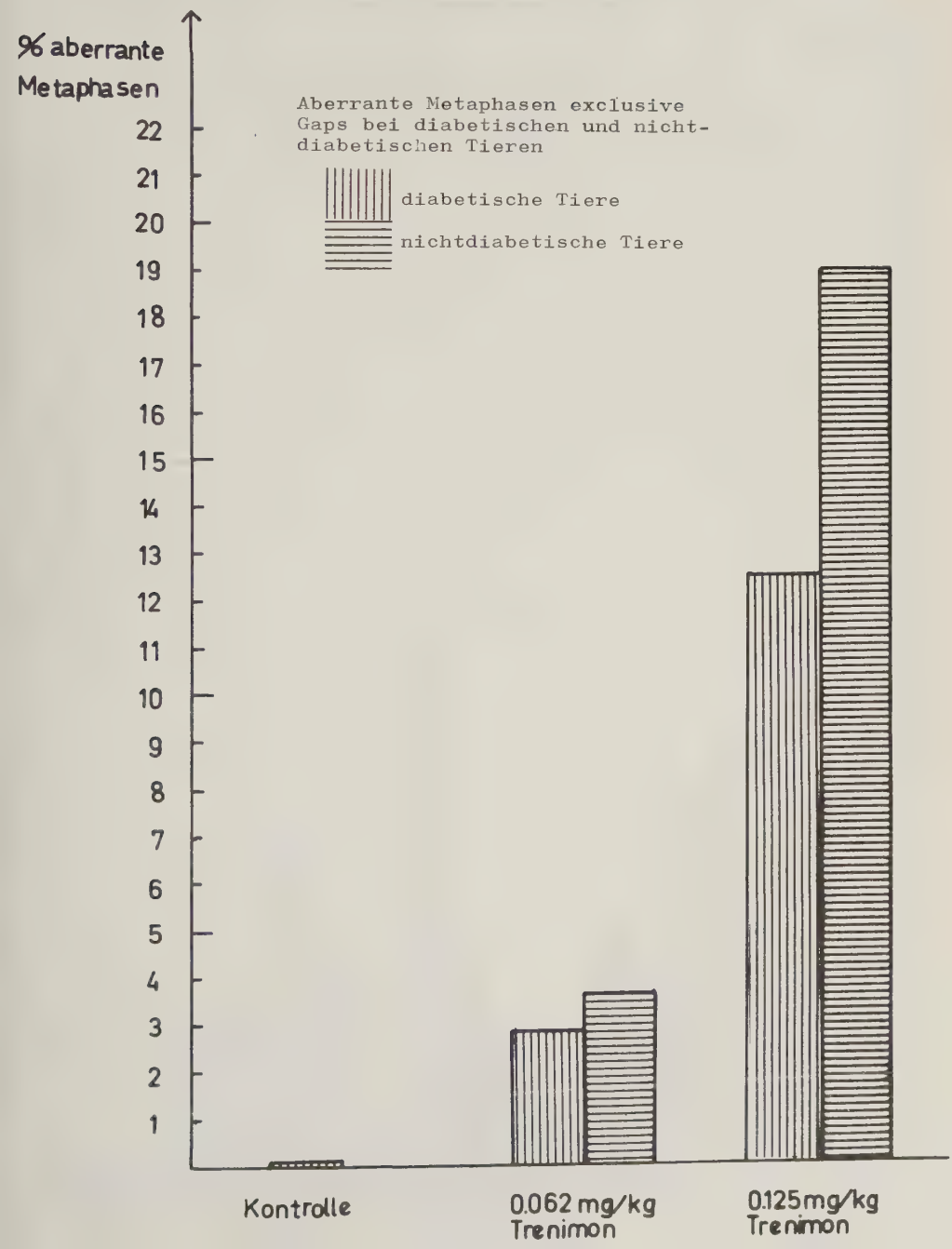
Graphik 2


% aberrante Metaphasen
Aberrante Metaphasen in- und exclusive Gaps bei nichtdiabetischen Tieren
inclusive Gaps
exclusive Gaps
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Kontrolle
0.062mg/kg Trenimon
0.125mg/kg Trenimon

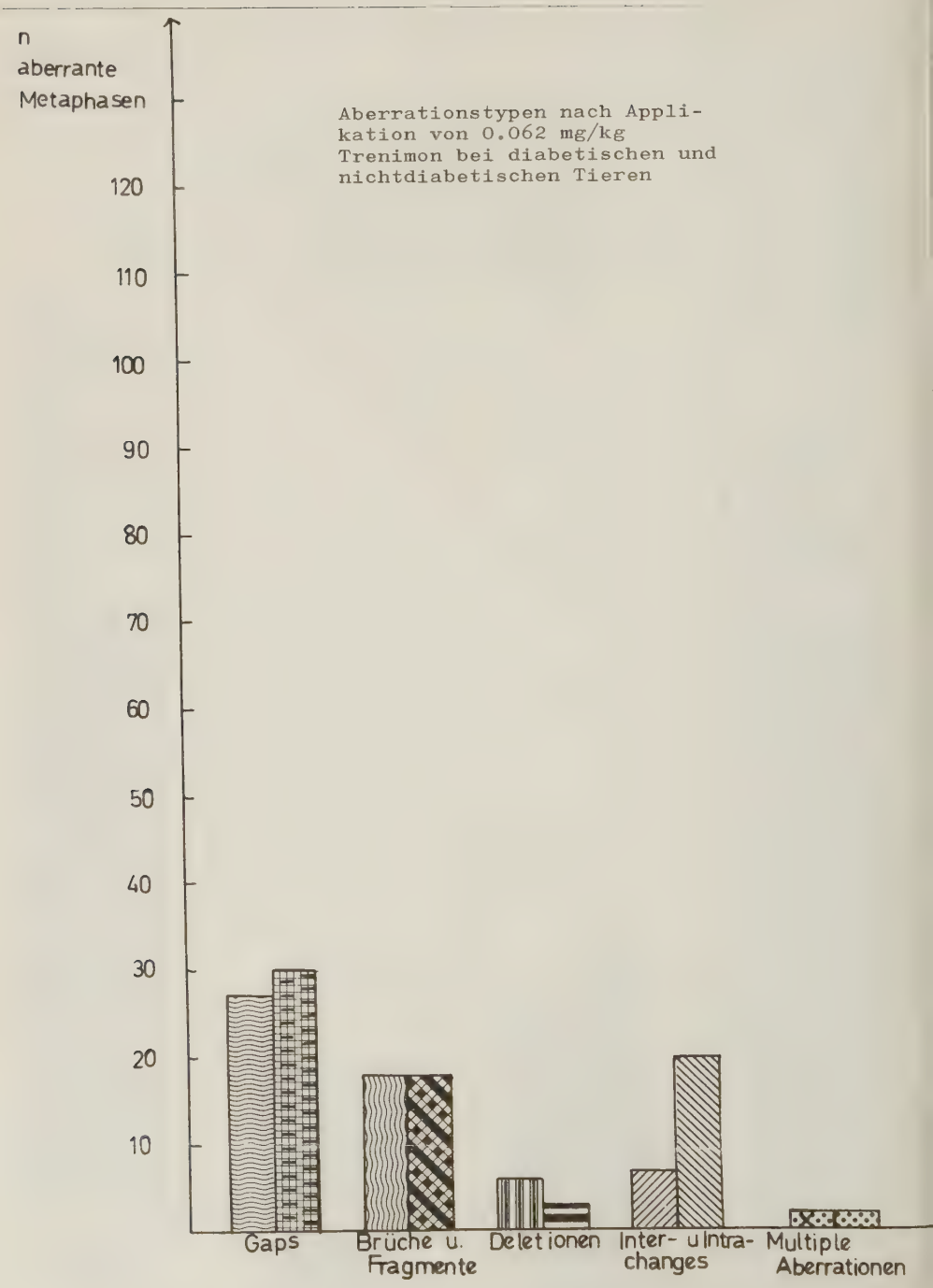
Graphik 3


% aberrante Metaphasen
Aberrante Metaphasen inclusive Gaps bei diabetischen und nicht-diabetischen Tieren
diabetische Tiere
nichtdiabetische Tiere
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Kontrolle
0.062 mg/kg Trenimon
0.125 mg/kg Trenimon

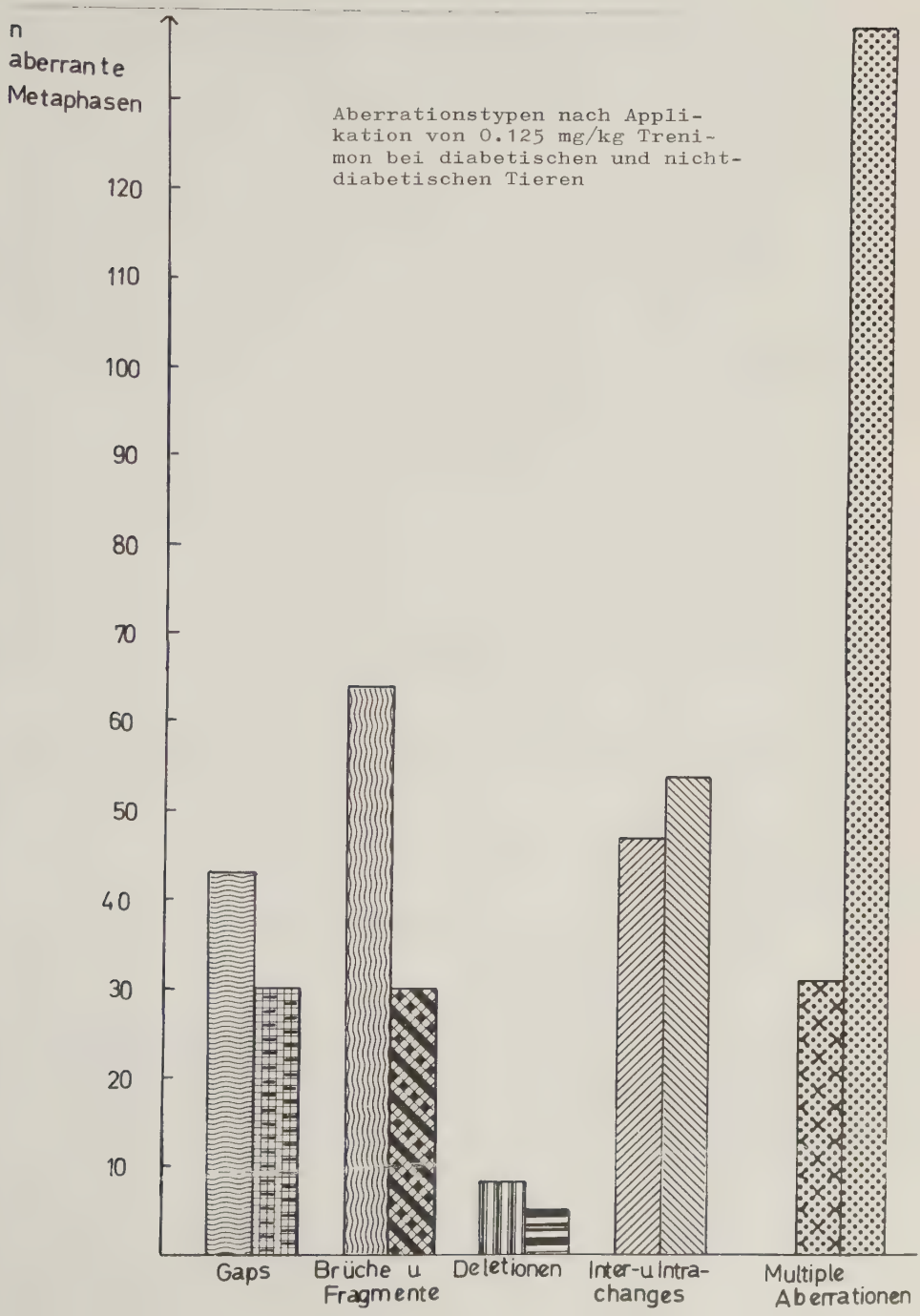
Graphik 4


% aberrante Metaphasen
Aberrante Metaphasen exclusive Gaps bei diabetischen und nicht-diabetischen Tieren
diabetische Tiere
nichtdiabetische Tiere
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Kontrolle
0.062 mg/kg Trenimon
0.125mg/kg Trenimon

Graphik 5


n
aberrante
Metaphasen
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
Aberrationstypen nach Applikation von 0.062 mg/kg Trenimon bei diabetischen und nichtdiabetischen Tieren
Gaps
Brüche u. Fragmente
Deletionen
Inter- u Intra-changes
Multiple Aberrationen

Graphik 6


n
aberrante
Metaphasen
Aberrationstypen nach Applikation von 0.125 mg/kg Trenimon bei diabetischen und nichtdiabetischen Tieren
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
Gaps
Brüche u Fragmente
Deletionen
Inter-u Intrachanges
Multiple Aberrationen

VI) Diskussion

Die niedrige Spontanmutationsrate in den Knochenmarkszellen des chinesischen Hamsters stellt einen Befund dar, den ich in der Literatur bestätigt fand (siehe Tab. 4).

Tabelle 4

Die Spontanmutationsrate des chinesischen Hamsters - Vergleich eigener Ergebnisse mit solchen in der Literatur:

Schmid und Staiger (1969)	Engelhardt (1975)	Matter (1976)	eigene Ergebnisse diabetisch/nichtdiab.	
0.67 %	4.00 %	1.25 %	0.42 %	0.33 %

Auch die Resultate, die ich nach der Behandlung der Tiere mit Trenimon erzielte, korrelieren gut mit denen von Schmid et al. (1971) und Matter (1976), die ebenfalls chinesischen Hamstern Trenimon zweimal im Abstand von 24 Stunden verabreichten. Die fast durchweg geringfügig niedrigere Aberrationsrate in meinem Untersuchungsmaterial ergibt sich nach Schmid et al. (1971) aus dem längeren Intervall zwischen zweiter Trenimonapplikation und Aufarbeitung in meinem Versuchsaufbau, nämlich 12 Stunden. Matter arbeitete seine Tiere bereits nach vier Stunden auf, Schmid et al. nach sechs Stunden. Nach Schmid et al. liefert die Aufarbeitung nach sechs bis acht Stunden die höchsten Aberrationsraten, die Zehn-, Vierzehn- und Achtzehnstundenwerte liegen um 10 % bis 20 % niedriger.

Tabelle 5

Raten aberranter Zellen im Knochenmark des chinesischen Hamsters nach 0.062 mg/kg Trenimon:

	Schmit et al.	Matter	eigene Ergebnisse	
			diabetisch/nichtdiab.	
% normale Zellen	90.9	90.3	95.0	93.9
% mit 1 bis 2 Aberrationen	9.1	9.0	4.7	5.9
% mit multiplen Aberrationen incl. Pulverisat.	0.0	0.7	0.2	0.2

Tabelle 6

Raten aberranter Zellen im Knochenmark des chinesischen Hamsters nach 0.125 mg/kg Trenimon:

	Schmid et al.	Matter	eigene Ergebnisse	
			diabetisch/nichtdiab.	
% normale Zellen	77.6	82.0	83.9	78.5
% mit 1 bis 2 Aberrationen	12.2	14.7	13.5	9.9
% mit multiplen Aberrationen incl. Pulverisat.	10.2	3.3	2.6	11.5

Auch die Aberrationstypen in dieser Arbeit - Gaps, Chromatiden- und Chromosomenbrüche, Fragmente, Deletionen, vereinzelte Ringchromosomen, Exchangefiguren - entsprechen denen der beiden Autoren. Das Auftreten einzelner pulverisierter Metaphasen nach der hohen Dosis von 0.125 mg/kg bei insgesamt hoher Aberrationsrate läßt sich mit den Resultaten von Schmid et al. vergleichen und stellt nur einen "kontinuierlichen Übergang von der Einzelaberration über Mehrfachveränderungen zur kompletten Pulverisation dar".

Die Resultate meiner Untersuchungen lassen zu, beide zu Beginn dieser Arbeit gestellten Fragen mit "nein" zu beantworten:

1) Die spontane Aberrationsrate der hier untersuchten diabetischen Hamster lag nicht signifikant über der stoffwechselgesunder, sondern es fand sich in beiden Fällen die in der Literatur mehrfach beschriebene niedrige Rate von unter oder um 1 %.

2) Die Veränderungen der Knochenmarkszellen der diabetischen Hamster zeigten nach Applikation des bekannten Mutagens Trenimon eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung, lagen jedoch weder in der niedrigen noch in der hohen Dosierung über denen der stoffwechselgesunden Tiere.

Ausgehend von diesen Resultaten liegt der Schluß nahe, daß für die unter den Nachkommen diabetischer Mütter gehäuft auftretenden Mißbildungen wahrscheinlich nicht durch die diabetische Stoffwechsellage bedingte mutagene Veränderungen der Keimzellen verantwortlich zu machen sind, sondern daß klassische teratogene Faktoren, wie zum Beispiel Hypoxie, Hyper- und Hypoglykämie die Entwicklung der Frucht in utero beeinflussen dürften.

Da spätestens seit den Ergebnissen der Mutagenitätsuntersuchungen von Bignami et al. (1974) und Watson et al. (1976) die in der oralen Diabetestherapie eingesetzten Sulfonylharnstoffe in den Verdacht geraten, Chromosomenaberrationen hervorzurufen, sollte sich eine umfassende, vergleichende Mutagenitätsprüfung oraler Antidiabetika anschließen.

VII) Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob sich diabetische und nichtdiabetische Hamster sowohl hinsichtlich ihrer Spontanraten an Chromosomenaberrationen als auch hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von Chromosomenaberrationen durch ein Standardmutagen unterscheiden. Die Prüfung dieser Frage erfolgte an Zellen des Knochenmarks des chinesischen Hamsters Cricetulus griseus.

Es zeigte sich, daß diabetische und nichtdiabetische Individuen eine gleich hohe Rate spontaner Chromosomenaberrationen aufweisen.

Auch nach Behandlung mit Trenimon zeigten diabetische und nichtdiabetische Tiere eine ähnlich hohe Empfindlichkeit gegenüber der Auslösung von Chromosomenaberrationen.

Sowohl diabetische als auch nichtdiabetische Individuen zeigten eine Dosisabhängigkeit der mutagenen Wirkung von Trenimon.

VIII) Bildanhang

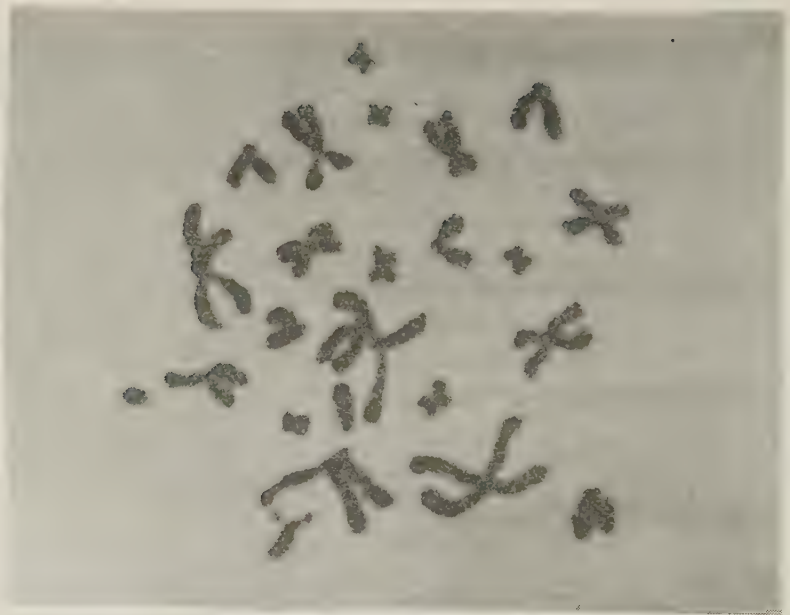


Bild 1 : Befund bei einem nichtdiabetischen Weibchen nach Applikation von 2 x 0.125 mg/kg Trenimon: drei Chromatidenbrüche bei 6 und 8 Uhr.

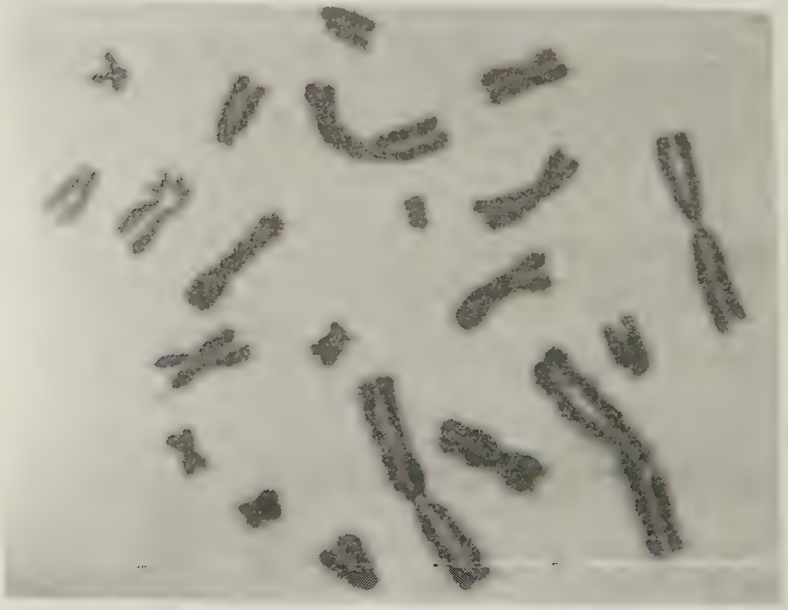


Bild 2 : Befund bei einem diabetischen Weibchen nach Applikation von 2 x 0.125 mg/kg Trenimon: Gap bei 4, Interchange bei 10 Uhr.

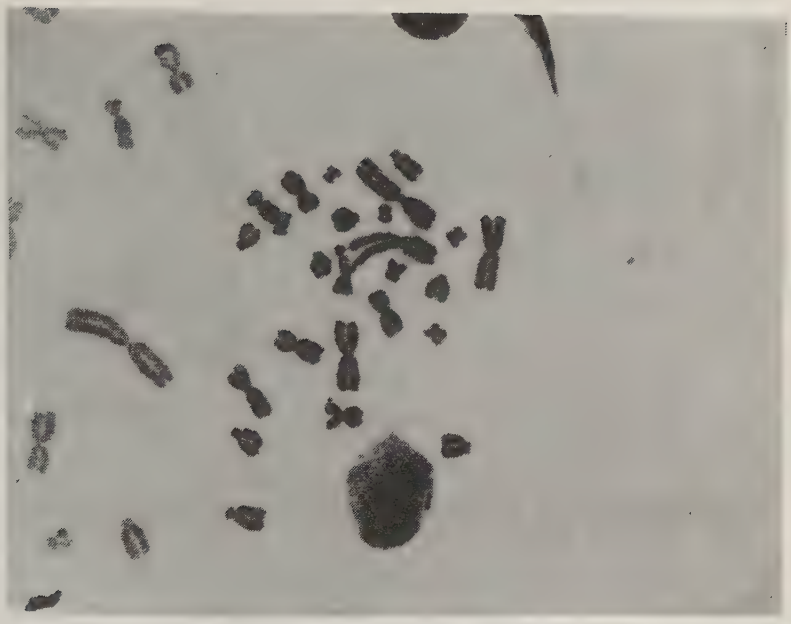


Bild 3 : Befund bei einem nichtdiabetischen Männchen nach Applikation von 2 x 0.125 mg/kg Trenimon: Interchanges im Zentrum der Metaphaseplatte und bei 10 Uhr

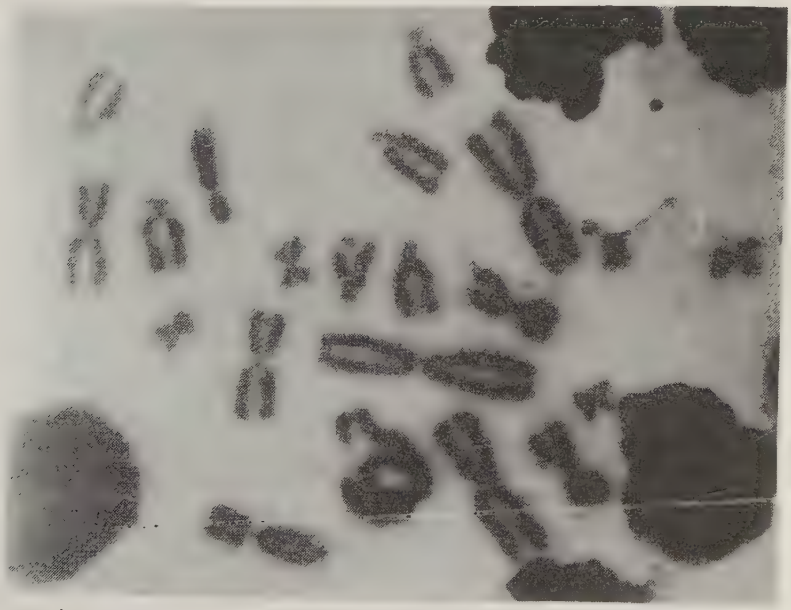


Bild 4 : Befund bei einem nichtdiabetischen Männchen nach Applikation von 2 x 0.125 mg/kg Trenimon: Gap im Zentrum, Ringchromosom bei 6 Uhr.

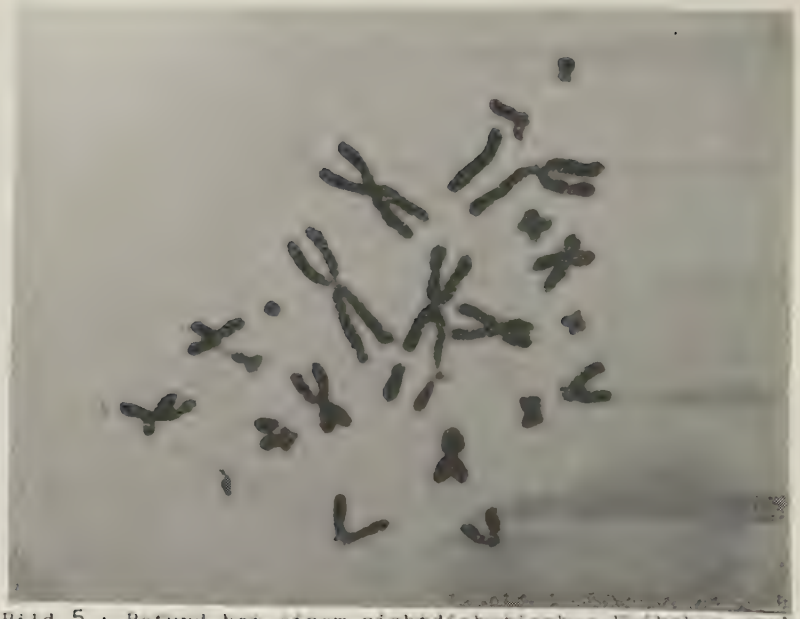


Bild 5 : Befund bei einem nichtdiabetischen Weibchen nach Applikation von 0.125 mg/kg Trenimon: multiple Aberrationen mit Interchanges im Zentrum und bei 1 Uhr.

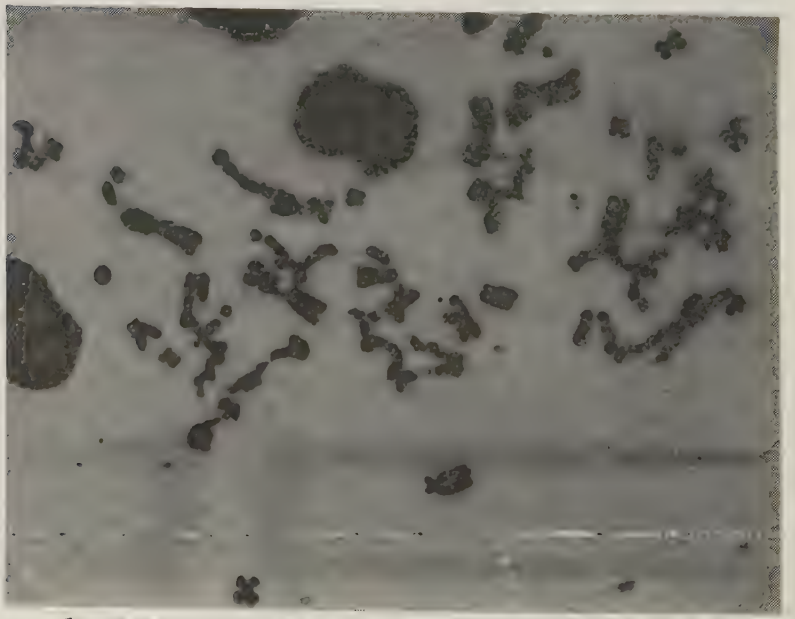


Bild 6 : Befund bei einem nichtdiabetischen Männchen nach Applikation von 2 x 0.125 mg/kg Trenimon: zwei mehrfach aberrante Metaphasen nebeneinander

IX) Literaturverzeichnis

Adam, P.A.J., Teramo, K., Raiha, N., Gitlin, D., Schwartz, R.:

Human Fetal insulin metabolism early in gestation. Response to acute elevation of the fetal glucose concentration and placental transfer of human insulin-I-131. Diabetes, 18, 409-15 (1969)

Amendt, P.:

Die somatisch-geistige Entwicklung von Kindern diabetischer Mütter: Ergebnisse einer Nachuntersuchung im Alter zwischen 4 und 16 Jahren. Acta Pädiatr. Acad. Sci. Hung., 16, 299-315 (1975)

Amendt, P., Gödel, E., Amendt, U., Becker, G.:

Mißbildungen bei mütterlichem Diabetes mellitus unter besonderer Berücksichtigung des kaudalen Regressionssyndroms. Zbl. Gynäk., 96, 950 (1974)

Basler, A., Buselmaier, B., Röhrborn, G.:

Elimination of spontaneous and chemically induced aberrations in mice during early embryogenesis. Hum. genet., 33, 121-130 (1976)

Bautz, F., Freese, E.:

On the mutagenic effect of alkylating agents. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash), 47, 1585-1594 (1960)

Berndt, H., Rieche, K.:

Chemotherapie des Krebses. Merksätze für die ärztliche Fortbildung. Z. ärztl. Fortbildung (Jena), 68, 193-195 (1974)

Bignami, M., Morpurgo, G., Pagliari, R., Carere, A., Conti, G., Guiseppe, G. de:

Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus nidulans. Mut. Res., 26, 159-170 (1974)

Blau, H.J.:

Über Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Zytostatika im Kindesalter. Kinderärztl. Praxis, 44, 264-272 (1976)

Blumel, J., Evans, E.B., Eggers, G.W.:

Partial and complete agenesis or malformation of the sacrum with associated anomalies. J. Bone Surg., 41, A, 497-517 (1959)

Brookes, P., Lawley, P.D.:

The reaction of mono- and difunctional alkylating agents with nucleic agents. Blochem. J., 80, 496-503 (1961)

Brookes, P., Lawley, P.D.:

Effects of alkylating agents on T 2 and T 4 bacteriophagum. Biochem. J., 89, 138-144 (1963)

Brookes, P., Lawley, P.D.:

Alkylating agents. British med. Bull., 20, 91-95 (1964)

Brunk, R.:

Spontandiabetes bei Tieren. In: Insulin: Handbuch exp. Pharmakologie XXXII/1,Ed. Dörzbach, E., Springer Verlag 1971, 203-272

Bucher, C.:

Cytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. Sammlung medizinischer Lehr- und Handbücher für Ärzte und Studierende, V. Band, Medizinischer Verlag Hans Huber Bern-Stuttgart-Wien, 1973, 253-306

Büchner, F.:

Differenzierungsstörungen im mittleren und hinteren Körperdrittel des Hühnchens nach experimentellem Sauerstoffmangel in der Frühentwicklung. Beitr. path. Anat., 115, 617-643 (1955)

Butler, L.:

The inheritance of diabetes in the Chinese hamster, Diabetologia, 3, 124-129 (1967)

Butler, L., Gerritsen, G.C.:

A comparison of inheritance of diabetes in the Chinese hamster and the KK mouse. Diabetologia, 6, 163-167 (1970)

Carpenter, A.M., Gerritsen, G.C., Dulin, W.E., Lazarow, A.:

Islet and beta cell volumes in diabetic Chinese hamsters and their non-diabetic siblings. Diabetologia, 3, 92-96 (1967)

Chlud, K.:

Rheumatologische Krankheitsbilder. Derzeitiger Stand der cytostatischen Therapie. Verh. dtsch. Ges. Rheumatol., 3, 257-260 (1974)

Chung, C.S., Myrianthopoulos, N.C.:

Factors affecting risks of congenital malformations. II. Effect of maternal diabetes on congenital malformations. Birth defects, 11, 23-38 (1975)

Clark, D.G., Hilaris, B.S., Ochoa, J.R., Freel, J.H.:

Interdisciplinary approach to advanced ovarian cancer. Surg. clin. North. Am., 54, 897-904 (1974)

Cohen, M.M. Shklar, G., Yerganian, G.:

Periodontal pathology in a strain of Chinese hamster, cricetulus griseus, with hereditary diabetes mellitus. Amer. J. Med., 31, 854-867 (1961)

Creutzfeld, W., Köbberling, J., Neel, J.V.:

The genetics of diabetes mellitus. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1976

Cudworth, A.G.:

Recent advances in the genetics of diabetes. J. Hum. Nutr., 30, 113-116 (1976)

Day, R.E., Insley, J.:

Maternal diabetes mellitus and congenital malformation. Survey of 205 cases. Arch. dis. childh., 51, 935-938 (1976)

De Meyer, R., Isaac-Mathy, M.:

A propos de l'action tératogène d'un sulfamide hypogycémiant (N-sulfanil-N-butylurée-BZ^{55}). Anns. Endocr., 19, 167-172 (1958)

Deuchar, E.M.:

Embryonic malformation in rats, resulting from maternal diabetes:preliminary observations. J. embryol. exp. morphol., 41, 93-99 (1977)

Domagk, G., Petersen, S., Gauss, W.:

Ein Beitrag zur experimentellen Chemotherapie der Geschwülste. Z. Krebsforsch., 59, 617-622 (1954)

Drury, M.I., Greene, A.T., Stronge, J.M.:

Pregnancy complicated by clinical diabetes mellitus. A study of 600 pregnancies. Obstet. gynecol., 49, 519-522 (1977)

Duhamel, B.:

From the mermaid to anal imperforation: the syndrome of caudal regression. Arch. dis. childh., 36, 152-155 (1961)

Dulin, W.E., Gerritsen, G.C.:

Interaction of genetics and environment on diabetes in the Chinese hamster as compared with human and other diabetic animal species. Acta diabet. lat., 9, Suppl. 1, 48-84 (1972)

Duraiswami, P.K.:

Insulin-induced skeletal abnormalities in developing chickens. Brit. med. J., 11, 384-390 (1950)

Engelhardt, G.:

Dissertationsschrift, Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg (1975)

Essex, N.L., yke, D.A., Watkins, P.J., Brudenell, J.N., Gamsu, H.R.:

Diabetic pregnancy. Brit. med. J., IV, 89-93 (1973)

Farquhar, J.W.:

The child of the diabetic woman. Arch. dis. childh., 34, 76 (1959)

Farquhar, J.W.:

Prognosis for babies born to diabetic mothers in Edinburgh. Arch. dis. childh., 44, 36 (1969)

Federlin, K., Schöffling, K., Schmitt, W., Pfeiffer, E.F.:

Hodenveränderungen des diabetischen chinesischen Hamsters. Z. Versuchstierk., 12, 99-100 (1970)

Förster, H., Mehnert, H.:

Kohlenhydratstoffwechsel. In: Klinische Pathophysiologie. Hrsgb. W. Siegenthaler, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 34-99 (1976)

Gabbe, S.G.:

Congenital malformations in infants of diabetic mothers. Obstet. gynecol. surv., 32, 125-132 (1977)

Gabbe, S.G., Mestmann, J.H., Freeman, R.K., Goebelsmann, U.T., Lowensohn, R.I., Nochimson, D., Cetrulo, C., Quilligan, E.J.:

Management and outcome of pregnancy in diabetes mellitus, classes b to r. Am. J. obstet. gynecol., 129, 123-732 (1977)

Gamsu, H.R.:

Neonatal morbidity in infants of diabetic mothers. J.R. soc. med., 71, 211-222 (1978)

Ganda, O.P., Soeldner, S.S.:

Genetic, acquired, and related factors in the etiology of diabetes mellitus. Arch. intern. med., 137, 461-469 (1977)

Gebhart, E.:

Experimentelle Beiträge zum Problem der lolen Achromasien (Gaps). Humangenetik, 13, 98-107 (1971)

Gebhart, E.:

Chemische Mutagenese. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York 1977

Gerritsen, G.C., Blanks, M.C.:

Characterization of Chinese hamster by metabolic balance, glucose tolerance and insulin secretion. Diabetologia, 10, 493-499 (1974)

Gerritsen, G.C. Blanks, M.C., Miller, R.L., Dulin, W.E.:

Effect of diet limitation on the development of diabetes in prediabetic Chinese hamsters. Diabetologia, 10, 559-565 (1974)

Gerritsen, G.C., Blanks, M.C., Schmitt, F.L.:

Environmental influences on the manifestation of diabetes in Chinese hamsters. In: The genetics of diabetes mellitus, Ed. by Creutzfeld, Köbberling, Neel Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1976

Gerritsen, G.C., Dulin, W.E.:

Characterization of diabetes in the Chinese hamster. Diabetologia, 3, 74-84 (1967)

Gerritsen, G.C., Needham, L.B., Schmidt, F.L., Dulin, W.E.:

Studies on the prediction and development of diabetes in offspring of diabetic Chinese hamsters. Diabetologia, 6, 158-162 (1970)

Goodman, M.J.:

Maternal diabetes and congenital malformations among live births in Hawaii. Acta diabetolog. lat., 13, 99-106 (1976)

Grodsky, G.M., Frankel, B.J., Gerich, J.E., Gerritsen, G.C.:

The diabetic Chinese hamster: in vitro insulin and glucagon release; the "chemical diabetic" and the effect of diet on ketonuria. Diabetologia, 10, 521-528 (1974)

Grunicke, H., Hirsch, F., Wolf, H., Bauer, U., Kiefer, G.:

Selective inhibition of thymidine transport at low doses of the alkylating agent Triethyleneiminobenzoquinone (Trenimon). Exp. cell. res., 90, 357-364 (1975)

Gundersen, K., Yerganian, G., Lin, B.J., Gagnon, H., Bell, F. McRae, W., Onsberg, F.:

Diabetes in the Chinese hamster, some clinical and metabolic aspects. Diabetologia, 3, 85-91 (1967)

Hampel, K.E.:

Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. Int. Z. klin. Pharmakol. Ther. Toxikol., 1, 322-371 (1968)

Henley, W.E.:

Diabetes and pregnancy. New Zealand Medical Journal, 46, 386-397 (1947)

Herberg, L.:

Die spontan diabetischen Tiere. In: Handbuch Innere Medizin, Bd. Diab. mell., Hrsgb. K. Oberdisse, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 561-638 (1975)

Herre, H.D., Horkỳ, Z.:

Die Mißbildungsfrequenz bei Kindern diabetischer Mütter. Zbl. Gynäkol., 86, 758 (1964)

Hunstein, W., Rehn, K.:

Tomorinduktion durch Zytostatika beim Menschen. Dtsch. med. Wochenschr., 100, 155-158 (1975

Jackson, W.P.U.:

Sulphonylureas in the management of human diabetes. In: G.D. Campbell (ed.) Oral Hypoglycamic Agents. Academic Press, London, 135-192 (1969)

Jackson, W.P.U., Campbell, G.D., Notelowitz, M., Blumsohn, D.:

Tolbutamide and chlorpropamide during pregnancy in human diabetes. Diabetes, 11 (Suppl.), 98-101 (1962)

Jervell, J., Moe, N., Skjaeraasen, N., Blystad, W., Egge, K.:

Diabetes mellitus and pregnancy - management and results at Rikshospitalet, Oslo, 1970-1977. Diabetologia, 16, 151-155 (1979)

Kaether, M., Franz, G.:

Behandlungsergebnisse von Kollumkarzinomen im Zeitraum 1962 bis 1966. Zbl. Gynäkol., 97, 1537-1548 (1975)

Kalhan, S.C., Schwartz, R., Adam, P.A.J.:

Placental barrier to insulin-I-125 in insulin-dependent diabetic mothers. J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 139-42 (1975)

Karlsson, K., Kjellmer, I.:

The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. Am. J. obstet. gynecol., 112, 213 (1972)

Kaufmann, W., Gebhart, E., Horbach, L.:

Determination of the Threshold value of the mutagenic activity of trenimon on human lymphocytes "in vitro". Humangenetic, 20, 1-8 (1973)

Keitel, W., Tanner, E., Fischer, H., Oppermann, J., Kunze, M., Paliege, R.:

Die immunsuppressive Therapie der Rheumatoiden Arthritis. Gemeinschaftsauswertung von Einrichtungen im Rahmen der AFG Rheumatologie Jena. Z. ges. Inn. Med., 29, 878-882 (1974)

Kitzmiller, J.L., Cloherty, J.P., Younger, M.D., Tabatabaii, A., Rothchild, S.B., Sosenko, I., Epstein, M.F., Singh, S., Neff, R.K.:

Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. Am. J. Obstet. Gynecol., 131, 560-80 (1978)

Koller, O.:

Diabetes and pregnancy. Acta obstet. gynec. scand., 32, 80-103 (1953)

Komrower, G.M.:

Maternal diabetes and congenital malformation (letter). Arch. dis. childh., 52, 519 (1977)

Koontz, W.W., Prout, G.R.:

Agenesis of the sacrum and the neurogenic bladder, J. Amer. Med. Ass., 203, 481-486 (1968)

Kredel, L., Tittor, W.:

Chemotherapie maligner Tumoren. Hippokrates, 46, 333-351 (1975)

Kucera, J., Lenz, W., Maier, W.:

Mißbildungen der Beine und der Wirbelsäule bei Kindern diabetischer Mütter. Dtsch. med. Wschr., 90, 901 (1965)

Kunze, M., Paliege, R., Tanner, E.:

Über den Langzeittherapieeffekt von Trenimon bei Polyarthritis chronica progressiva. Z. gesamte Inn. Med., 30, 676-679 (1975)

Lawley, P.D., Brookes, P.:

Acidic dissociation of 7:9 dialkylguanine and its possible relation to mutagenic properties of alkylating agents. Nature, 192, 1081-1082 (1961)

Lenz, W., Maier, W.:

Congenital malformations and maternal diabetes. Lancet, II, 1124-1125 (1964)

Lenz, W., Kucera, J.:

Létiologie de la régression caudale (agénésie du sacrum). Médecine et Hygiène, 25, 241-241 (1964)

Like, A.A., Gerritsen, G.C., Dulin, W.E., Gaudreau, P.:

Studies in the diabetic Chinese hamster: electron microscopy of pancreatic islets. Diabetologia, 10, 509-520 (1974)

Like, A.A., Orci, L.:

Embryogenesis of the human pancreatic islets: a light and electron microscopic study. Diabetes, 21, 511-34 (1972)

Linke, A.:

Die Behandlung der Hämoblastosen und malignen Tumoren mit Trisäthyleniminobenzochinon. Dtsch. med. Wschr., 85, 1928-1936 (1960)

Lüers, H., Röhrborn, G.:

Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. III. Äthylenimine. Mut. Res., 2, 29-44 (1965)

Malins, J.M., Cooke, A.M., Pyke, D.A., Fitgerald, M.E.:

Sulphonylurea drugs in gragnancy. Brit. Med. J., 2, 187 (1964)

Malins, J.M.:

Congenital malformations and fetal mortality in diabetic pregnancy. J.R. Soc. Med., 71, 205-207 (1978)

Martin, T.R., Allen, A.C., Stinson, D.:

Overt diabetes in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 133, 275-80 (1979)

Matter, B.E.:

Failure to detect chromosome damage in bone marrow cells of mice and Chinese hamsters exposed in vivo to some ergot derivates. J. Int. Med. Res., 4, 382-392 (1976)

Matter, B.E., Grauwiler, J.:

Micronuclei in mouse bone-marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. Mut. Res., 23, 239-249 (1974)

McCombs, H.L., Gerritsen, G.C., Dulin, W.E., Chobanian, A.V.:

Morphologic changes in the aorta of the diabetic Chinese hamster. Diabetologia, 10, 601-606 (1974)

McKeown, T., Record, R.G.:

Malformations in a population observed for five years after birth. In: Ciba Foundation Symposium on Congenital Malformations, J. & A. Churchill, London 1960

Meier, H., Yerganian, G.A.:

Spontaneous hereditary diabetes mellitus in Chinese hamster (Cricetulus griseus) I. Pathological findings. Proc. Soc. exp. Biol., 100, 810-15 (1959)

Mills, J.L., Baker, L., Goldman, A.S.:

Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. Diabetes, 28, 292-93 (1979)

Obe, G.:

Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. V. Vergleichende Untersuchung der Wirkung von Äthyleniminen auf menschliche Keukozytenchromosomen. Mut.Res., 6, 467-471 (1968)

von Oldershausen, H.-F.:

Diabetes mellitus. In: Lehrbuch der Inneren Medizin. Hrsgb. R. Gross und P. Schölmerich, Schattauer Verlag 773-803 (1977)

Pache, H.D.:

Pathologie der Vorgeburtsperiode. In: Lehrbuch der Kinderheilkunde. Hrsgb. A. Wiskott, K. Betke, W. Künzer Georg Thieme Verlag Stuttgart 6.1-6.6 (1977)

Passarge E., Lenz, W.:

Syndrome of caudal regression in infants of diabetic mothers: observations of further cases. Pediatrics, 37, 672-675 (1966)

Pedersen, J.:

The pregnant diabetic and her newborn. Munksgaard Copenhagen (1967)

Pedersen, L.M., Tygstrup, I., Pedersen, J.:

Congenital malformations in newborn infants of diabetic women. Correlation with diabetic vascular complications. Lancet I, 1124-1126 (1964)

Pedersen, J., Pedersen, L.M. Andersen, B.:

Assessors of fetal perinatal mortality in diabetic pregnancy. Analysis of 1332 pragnancies in the Copenhagen series. Diabetes, 23, 302-305 (1974)

Pfeifer, R.A., Lenz, W.:

Skelettmißbildungen der unteren Körperhälfte bei Kindern diabetischer Mütter. Mschr. Kinderheilk., 116, 221-222 (1968)

Raydt, G., Holzweber, F., Puschendorf, B., Grunicke, H.:

Depression of the intracellular histone messenger RNA content by the alkylating agent 2,3,5 trisethyleneiminobenzoquinone. Febs. Lett., 74, 111-114 (1977)

Renold, A.E.:

Spontaneous diabetes in laboratory rodents. Advances in metabolic disorders, 3, L. Levine, R. Luft (eds.), Academic Press New York London, 49-84 (1968)

Renold, A.E., Young, D.B.A.:

Possible chemical defects in diabetes mellitus in man and hereditary diabetes mellitus in animals. Proc. II Internat. Congr. Endocr. London 1964, II. Internat. Congr Ser. No. 83, Excerpta med (Amst.) 883-887 (1965)

Rick, W.:

Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg,New York 1977

Röhrborn, G.:

Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene. Experimentia, 16, 523-539 (1960)

Röhrborn, G.:

Mutagene Wirkung von alkylierenden Substanzen. In: Wilmanns, H., Chemotherapie maligner Tumoren. 3. Bielefelder Symposium, Nov. 1962, Schattauer Verlag Stuttgart 1964

Röhrborn, G.:

Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. Humangenetik, 1., 205-231 (1965)

Röhrborn, G.:

Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus. Humangenetik, 1, 576-578 (1965)

Röhrborn, G.:

Über einen Geschlechtsunterschied in der mutagenen Wirkung von Trenimon bei der Maus. Humangenetik, 2, 81-82 (1966)

Röhrborn, G.:

Miochemical mechanisms of mutations. In: F. Vogel, G. Röhrborn (eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970

Röhrborn, G., Kühn, O., Hansmann, I., Thon, K.:

Induced chromosome aberrations in early embryogenesis of mice. Hum. Genet., 11, 316-322 (1971)

Röhrborn, G., Hansmann, I.:

Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice. Hum. Genet., 13, 184-198 (1971)

Röhrborn, G., Vogel, F.:

A search for dominant mutations in F 1 progeny of male mice treated with Trenimon. Hum. Genet., 7, 43-50 (1969)

Ross, W.C.J.:

Biological alkylating agents. London Butterworth (1962)

Rowland, T.W., Hubbel, J.P., Nadas, S.:

Congenital heart disease in infants of diabetic mothers. J. Pediat., 83, 815 (1973)

Rubin, A., Murphy, D.P.:

The frequency of congenital malformations in the offspring of non-diabetic and diabetic individuals. J. Pediat., 53, 579-585 (1958)

Rübsaamen, H.:

Zur experimentellen Pathologie der Mißbildungen. In: Zur Orthologie und Pathologie der Perinatalperiode unter Einbeziehung embryologischer Gesichtspunkte. Ergebn. exp. Med., 4, 208-216 (1971)

Rusnak, S.L., Driscoll, S.G.:

Congenital spinal anomalies in infants of diabetic mothers. Pediatrics, 35, 989-995 (1965)

Schlaepfer, W.W., Gerritsen, G.C., Dulin, W.E.:

Segmental demyelination in the distal peripheral nerves of chronical diabetic Chinese hamsters. Diabetologia, 10, 541-548 (1974)

Schmid, W., Araraki, D.T., Breslau, N.A., Culbertson, J.C.:

Chemical mutagenesis. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test systeme. 1. Cytogenetic results on basic aspects of the methology, obtained with alkylating agents. Hum. Genet., 11, 103-118 (1971)

Schmid, W., Staiger, G.R.:

Chromosome studies on bone marrow from Chinese hamsters treated with benzodiazepine tranquillizers and cyclophosphamide. Mut. Res., 7, 99-108 (1969)

Schmidt, F.L., Leslie, L.G., Schultz, J.R., Gerritsen, G.C.:

Epidemiological studies of the Chinese hamster. Diabetologica, 6, 154-157 (1970)

Schönenberg, H.: Das Syndrom der caudalen Hypoplasie. Helv. paediat. Acta, 26, 88-97 (1971)

Seidel, R. Reissmann, K., Land, H., Roedel, J.:

Immunsuppressive Behandlung bei progressiv chronischer Polyarthritis. Z. gesamte Inn. Med., 30, 535-538 (1975)

Siering, V.H., Abendroth, K.:

Prinzipien der Wirkung von Zytostatika. Z. gesamte Inn. Med., 29, 866-870 (1974)

Siering, H., Felsch, G., Barthel, E.:

Erfahrungen mit der zytostatischen Behandlung maligner Tumoren. Z. gesamte Inn. Med., 31, 65-69 (1976)

Sirek, A.:

Spontaneous hereditary diabetes mellitus in laboratory animals. Handb. Diab. mell. I, Hrsgb. E.F. Pfeiffer, Lehmann Verlag München 715-726 (1969)

Soler, N.G.:

Perinatal medicine. Stockholm, Fifth European Congress of Perinatology, p. 108 (1976)

Soler, N.G., Walsh, C.H., Malins, J.M.:

Congenital malformations in infants of diabetic mothers. Q.J. Med., 45, 303-313 (1976)

Soret, M.G., Dulin, W.E., Gerritsen, G.C.:

Microangiopathy in animals with spontaneous diabetes. In: Early Diabetes, Suppl. 2. Advances in metabolic disorders. R. Camerini-Davalos, H. S. Cole (eds.), 291-298. Academic Press New York, London (1973)

Soret, M.G., Dulin, W.E., Mathews, J., Gerritsen, G.C.:

Morphologic abnormalities observed in retina, pancreas and Kidney of diabetic Chinese hamsters. Diabetologia, 10, 567-579 (1974)

Stauffacher, W., Orci, L., Cameron, D.P., Burr, J.M., Renold, A.E.

Spontaneous hyperglycemia in laboratory rodents. An example of the possible usefulness of animal disease models with both genetic and environmental components. Rec. Progr. Horm. Res., 27, 41-95 (1971)

Stehbens, J.A., Baker, G.L., Kitchell, M.:

Outcome at ages 1, 3, and 5 years of children born to diabetic women. Am. J. Obstet. Gynecol., 127, 408-413 (1977)

Steinke, J., Driscoll, S.:

The extractable insulin content of pancreas from fetuses and infants of diabetic and control mothers. Diabetes, 14, 573-78 (1965)

Stoian, V., Raicu, P.:

Morphological characteristics and the nature of gaps (achromatic lesions) induced by 4-aminouracil in chromosomes of Vicia faba. Mut. Res., 28, 217-220 (1975)

Thalhammer, O., Lackmann, D., Scheibenreiter, S.:

"Caudale Regression" beim Kind einer 18 jährigen Frau mit Prädiabetes. Z. Kinderheilk., 102, 346-355 (1968)

Tischendorf, W., Meyer-Hofmann, G.:

Die Therapie der Hämoblastosen in der kritischen Sicht des Klinikers. Dtsch. med. Wschr., 86, 1592-1595 und 1676-1680 (1961)

Vogel, F., Jäger, P.:

The genetic load of human population due to cytostatic agents. Hum. Genet., 7, 287-304 (1969)

Vogel, F., Röhrborn, G., Hansmann, I.:

Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität. Arzneim. Forsch., 24, 1665-1677 (1974)

Watson, W.A.F., Petrie, J.C., Galloway, D.B., Bullock, J., Gilbert, J.C.:

In vivo cytogenetic activity of sulphonurea drugs in man. Mut. Res., 38, 71-80 (1976)

White, P.:

Pregnancy complicating diabetes. In: Treatment of diabetes mellitus by E.P. Joslin. 10th ed., Lea & Febinger Philadelphia, 690 (1959)

Wickes, J.G.:

Foetal defects following insulin coma therapy in early pregnancy. Brit. Med. J., 2, 1029-1030 (1954)

Wilde, J.:

Probleme der Chemotherapie beim operierten Bronchialkarzinom. Z. Erkr. Atmungsorgane, 142, 101-109 (1975)

Wilson, J.S., Vallance-Owen, J.:

Congenital deformities and insulin antagonism. Lancet II, 940 - 941 (1966)

Wolf, H., Raydt, G., Puschendorf, B., Grunicke, H.:

Effect of the alkylating agent triethyleneiminobenzoquinone on the synthesis of DNA and on the incorporation of 3h-lysine into nuclear proteins of Ehrlich ascites tumor cells. Febr. Lett., 35, 336-340 (1973)

Yerganian, G.A.:

Spontaneous diabetes mellitus in the Chinese hamster, cricetulus griseus, IV. Genetic aspects. Ciba Found. Colloq. Endocr., 15, 25-48 (1964)

Mein Dank gilt Herrn Professor Röhrborn für die freundliche Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung beim Zustandekommen der Arbeit.

Herrn Dr. Basler danke ich herzlich für wertvolle Hinweise zur praktischen Durchführung.

Herrn Prof. Gries verdanke ich fruchtbare Anregungen in der Diskussion der Ergebnisse.

Nicht zuletzt danke ich Frau Mehnert für ihre Hilfe bei den Fotoarbeiten und Frau Pingsmann für das Schreiben des Manuskripts.

Düsseldorf, im März 1981 Ute Rammelt

L E B E N S L A U F

Am 28. Dezember 1954 wurde ich als erstes Kind des Ingenieurs Friedrich Wilhelm Rammelt und seiner Ehefrau, der Lehrerin Regina Rammelt geb. Bauch, in Dortmund geboren. Am 1o. Mai 1958 wurde mein Bruder Jens geboren. Mein Vater starb im September 198o.

Von 1961 -1965 besuchte ich die Evangelische Volksschule Am Baum-Süd in Velbert, von 1965 -1973 das Neusprachliche Mädchengymnasium Friedrich-Ebert-Straße ebenda, das ich mit dem Reifezeugnis verließ.

Zum Wintersemester 1973 wurde ich an der Universität Düsseldorf für das Fach Medizin immatrikuliert, legte dort 1975 die Ärztliche Vorprüfung, 1976 den Ersten und 1979 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab,

Das Praktische Jahr absolvierte ich von April 1979 bis März 198o an der Universitätsklinik der Gesamthochschule Essen, wo ich am 1o. April 198o den schriftlichen und am 6. Mai 198o den mündlichen Teil des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung bestand.

Seit dem 1. August 198o befinde ich mich als Wissenschaftliche Assistentin an der Universitätskinderklinik Düsseldorf in der Ausbildung zum Arzt für Kinderheilkunde.